

LÚCIA PÉRET DE ALMEIDA

**CARACTERIZAÇÃO DE PIGMENTOS DA
Curcuma longa L., AVALIAÇÃO DA
ATIVIDADE ANTIMICROBIANA, MORFOGÊNESE
IN VITRO NA PRODUÇÃO DE CURCUMINÓIDES E
ÓLEOS ESSENCIAIS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutora em Ciência de Alimentos.

Orientadora: Prof^a Maria Beatriz Abreu Glória

**Faculdade de Farmácia da UFMG
Belo Horizonte, MG
2006**

FOLHA DE APROVAÇÃO

DEDICATÓRIA

*Aos meus pais Antônio Paulo e Maria José, as minhas filhas Paula e Bárbara verdadeiros motivadores desta caminhada
A toda a minha família,
Ao Brian pelo companheirismo, apoio e carinho
A todos que de alguma forma auxiliaram neste trabalho.*

*“Nunca ande pelo caminho traçado, ele conduz somente até onde os outros foram”
Graham Bell*

AGRADECIMENTOS

A professora Maria Beatriz de Abreu Glória, pela amizade, orientação, confiança e apoio, exemplo de dedicação e luta.

A Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia pela concessão da bolsa de doutorado e ao Professor Abel Rebouças São José pelo incentivo.

Ao Professor Ricardo José Alves pelo apoio incondicional em todos os momentos e aos alunos do Laboratório de Química Farmacêutica, Fafar, UFMG pelo estímulo e vibração. A amiga incansável Ana Paula Cherubino, pelo apoio e disposição no trabalho de identificação dos pigmentos.

A Professora Elzília Nunan pelos ensinamentos e apoio nas avaliações microbiológicas, além do carinho de todos os professores e funcionários do Laboratório de Controle de Qualidade de Medicamentos da Farfar, UFMG. A Cristina Naghetini pelo auxílio nas análises microbiológicas.

Ao Professor e incentivador José Eduardo Brasil Pereira Pinto pelos ensinamentos e ao Evandro que apoiaram e permitiram o desenvolvimento do trabalho no Laboratório de Cultura de Tecido Vegetal na Universidade Federal de Lavras.

A professora Ana Maria de Barros Dantas pelo apoio e liberação das instalações do laboratório de Farmacognosia I da Faculdade de Farmácia da UFMG e ao aluno e amigo Rafael pela disposição e participação na implantação da cultura de células.

Ao Professor Roberto Gonçalves Junqueira pelo apoio, amizade e auxílio na análise estatística deste trabalho.

Ao Professor Fernão Braga e os amigos do Laboratório de Fitoquímica da Fafar, UFMG pelo apoio

Ao Professor Jorge Mancini pela oportunidade de trabalhar e confiança, e pelo apoio de sua equipe de colaboradores e alunas, Rosangela, Elma, Fabiana, Cláudia e Maria de Lourdes do Laboratório de Lípidos na Universidade de São Paulo.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Ciência de Alimentos, amigos e incentivadores do meu trabalho, em especial aos professores, José Virgílio Coelho, David Lee e Marialice Pinto Coelho Silvestre.

Aos professores do Programa de Pós graduação em Ciências Farmacêuticas.

Aos amigos Marcos Costa Lage e Úrsula pelo carinho e apoio.

A Beatriz Depes Tallon Netto companheirismo, luta e amizade.

A Priscila Gomes e família pelo carinho, critério, apoio e amizade.

A Renata Barbosa de Oliveira pelo exemplo de determinação e, principalmente, pela amizade.

A amiga Renata Labanca pela força determinação, carinho e boa vontade sempre.

Ao Thiago Abreu Lima pelo imenso carinho, amizade e confiança.

Ao Milton Neto pelo carinho, amizade, determinação e bons momentos.

A Regilda pela oportunidade do contato e carinho mesmo de tão longe.

Aos meus queridos colegas e amigos do Laboratório de Bioquímica de Alimentos da Faculdade de Farmácia da UFMG aqui representados por Ana Amélia e família, Ana Paula, Cristina, Flávia Beatriz, Flávia, Giulianna, João, Karine, Paula, Raquel, Sílvia e Tânia.

Enfim, a todos com quem convivi durante a realização do Doutorado, muito obrigada!

“O valor das coisas não está no tempo que elas duram, mas na intensidade com que acontecem. Por isso existem momentos inesquecíveis, coisas inexplicáveis e pessoas incomparáveis”

Fernando Pessoa

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	09
LISTA DE FIGURAS	11
LISTA DE ABREVIATURAS	13
RESUMO	14
ABSTRACT	15
INTRODUÇÃO	16
REVISÃO DE LITERATURA	18
1 CARACTERÍSTICAS BOTÂNICAS DA CÚRCUMA	18
2 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA CÚRCUMA	19
2.1 Pigmentos curcuminóides	20
2.1.1 Características físico-químicas	20
2.1.2 Síntese	21
2.1.3 Extração, separação e quantificação	22
2.2 Óleos Essenciais	24
2.2.1 Características físico-químicas	24
2.2.2 Síntese	25
2.2.3 Extração	25
3 PROPRIEDADES NUTRACÊUTICAS DA CÚRCUMA	26
3.1 Atividade antimicrobiana	26
4. CULTURA DE TECIDOS	28
OBJETIVOS	31
MATERIAL E MÉTODOS	31
RESULTADOS	32
I. SEPARAÇÃO E DETERMINAÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DA CURCUMINA, DESMETOXICURCUMINA E BISDESMETOXICURCUMINA	33
1. INTRODUCTION	34
2. MATERIALS AND METHODS	35
2.1. Materials	35
2.2. Methods	36
2.2.1. Comparison of the efficiency of different solvent systems for the separation of curcuminoids pigments by TLC	36
2.2.2. Isolation of curcuminoids pigments	36
2.2.3. Physico-chemical characterization of the separated curcuminoid pigments ..	37
2.3. Methods of analisys	37
2.3.1. Determination of curcuminoid pigments by HPLC	37
2.3.2. Determination of the melting point	37
2.3.3. UV-visible spectrophotometry	37
2.3.4. Infrared spectroscopy	37
2.3.5. Nuclear magnetic resonance	38
2.3.6. CIE L*a*b* characteristics	38

3. RESULTS AND DISCUSSION	38
3.1. Comparison of TLC methods for the separation of curcuminoid pigments	38
3.2. Preparative separation of curcuminoids pigments	38
3.2.1. Crystallization of curcumin.....	39
3.2.2. CC separation of pigments from the mother liquor.....	39
3.3. Purity of curcuminoid pigments	39
3.4. Physico-chemical characteristics of the isolated curcuminoid pigments.	40
3.4.1. UV-visible spectra	40
3.4.2. Infrared spectra	41
3.4.3. ¹ H and ¹³ C NMR.....	41
3.4.4. CIE L*a*b* color characteristics	43
4. CONCLUSIONS	43
II. ATIVIDADE ANTIMICROBIANA <i>IN VITRO</i> DA CURCUMA E DERIVADOS	44
1. INTRODUÇÃO	45
2. MATERIAL E MÉTODOS	46
2.1 Material	46
2.2 Métodos	48
2.2.1 Determinação da atividade antimicrobiana <i>in vitro</i>	48
2.2.2 Determinação dos pigmentos curcuminóides.....	48
2.2.3 Caracterização do óleo essencial da cúrcuma.....	49
2.3 Análise estatística	49
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
3.1 Teores de eores de pigmentos curcuminóides nos extratos alcoólicos da cúrcuma e no óleo essencial	49
3.3 Atividade antimicrobiana <i>in vitro</i> dos extratos etanólicos da cúrcuma e dos pigmentos curcuminóides	51
3.4 Atividade antimicrobiana <i>in vitro</i> do óleo da cúrcuma	52
4. CONCLUSÕES	54
III. ESTABELECIMENTO DE GEMAS, INDUÇÃO E FORMAÇÃO DE PIGMENTOS CURCUMINÓIDES E ÓLEOS ESSENCIAIS EM CALOS E RAÍZES DA <i>Curcuma longa</i> L <i>IN VITRO</i>	55
1. INTRODUÇÃO	56
2. MATERIAL E MÉTODOS	58
2.1 Material	58
2.2 Métodos	59
2.2.1. Estudo da influência do meio de cultivo e de reguladores de crescimento no estabelecimento de gemas.....	60
2.2.2. Estudo da influência de reguladores de crescimento na indução de calos e de raízes durante o cultivo <i>in vitro</i> da cúrcuma em meio MS.....	61
2.2.3. Estudo da influência de diferentes concentrações de KNO ₃ e KCl no desenvolvimento de calos e raízes.....	63
2.2.4. Estudo da influência de diferentes concentrações de KNO ₃ e KCl na produção de pigmentos em calos e raízes.....	63
2.2.5. Estudo da influência de diferentes concentrações de KNO ₃ e KCl na produção de óleos essenciais em calos e raízes.....	64

2.3. MÉTODOS DE ANÁLISE	64
2.3.1. Determinação do desenvolvimento da cultura de célula <i>in vitro</i>	64
2.3.2. Determinação dos pigmentos curcuminóides.....	64
2.3.3. Determinação do perfil cromatográfico dos óleos essenciais.....	65
2.3.4. Determinação das características da cúrcuma em pó obtida dos rizomas cultivados em solo.....	66
2.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA	66
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	67
3.1. INFLUÊNCIA DO MEIO DE CULTIVO E DE REGULADORES DE CRESCIMENTO NO ESTABELECIMENTO DE GEMAS E NA PROPAGAÇÃO DA CÚRCUMA	67
3.1.1. Influência do meio de cultivo no estabelecimento de gemas	67
3.1.2. Influência dos reguladores de crescimento em meio de cultivo Murashige-Skoog no estabelecimento de gemas	68
3.1.3. Cultivo de plantas e caracterização dos rizomas produzidos.....	70
3.2. INFLUÊNCIA DOS REGULADORES DE CRESCIMENTO NA INDUÇÃO DE CALOS E RAÍZES DA CÚRCUMA EM MEIO MS	74
3.3. INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DOS SAIS DE POTÁSSIO NO DESENVOLVIMENTO DE CALOS E RAÍZES EM MEIO MS, NA PRESENÇA DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE ANA	76
3.3.1. Influência das concentrações de KNO ₃ e de KCl e de ANA no meio de cultivo MS no desenvolvimento de calos	76
3.3.2. Influência das concentrações de KNO ₃ e de KCl no desenvolvimento de raízes	79
3.4. INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DE SAIS DE POTÁSSIO EM MEIO MS, NA PRESENÇA DE TRÊS CONCENTRAÇÕES DE ANA NA FORMAÇÃO DE PIGMENTOS CURCUMINÓIDES EM CALOS E RAÍZES	83
3.4.1. Influência da concentração de sais de potássio (KNO ₃ e de KCl) em meio MS na formação de pigmentos curcuminóides em calos	83
3.4.2. Influência da concentração de sais de potássio (KNO ₃ e KCl) em meio MS na formação de pigmentos curcuminóides em raízes	86
3.5. INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DE SAIS DE POTÁSSIO EM MEIO MS, NA PRESENÇA DE TRÊS CONCENTRAÇÕES DE ANA NA FORMAÇÃO DE ÓLEOS ESSENCIAIS EM CALOS E RAÍZES	89
3.5.1. Influência da concentração de sais de potássio (KNO ₃ e KCl) na formação de óleos essenciais em calos	89
3.5.2. Influência da concentração de sais de potássio na formação (KNO ₃ e KCl) de óleos essenciais em raízes	92
4. CONCLUSÕES	99
CONCLUSÕES INTEGRADAS	100
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	104
APÊNDICE E ANEXOS	114
1. Abstract - Separation and determination of the physico-chemical characteristics of curcumin, demethoxycurcumin and bisdemethoxycurcumin	115
2. Cristais de pigmentos isolados com aumento de 100 X	116
3. Característica de cor entre dos pigmentos isolados.....	117
4. Presença de halos de inibição no estudo da atividade antimicrobiana	118
5. Preparo do meio de superfície para <i>C. albicans</i> e <i>S. Cereviseae</i>	119
6. Preparo do meio de superfície para <i>Aspergillus niger</i>	120

LISTA DE TABELAS

1	Composição centesimal de rizomas da cúrcuma originária do Brasil e da Índia	19
2	Pigmentos curcuminóides e óleos essenciais da cúrcuma originária do Brasil e da Índia	20
I.1	Different solvent systems on the separation of curcuminoid by TLC	36
I.2	Influence of successive crystallizations on curcumin levels.....	39
I.3	Types of curcuminoid pigments in different fractions collected during silica gel CC of the mother liquor using dichloromethane as eluent.....	39
I.4	Physico-chemical characteristics of the isolated curcuminoid pigments....	41
I.5	¹ H NMR spectral data of the isolated curcuminoid pigments	42
I.6	¹³ C NMR spectral data of the isolated curcuminoid pigments	42
I.7	Color characteristics of the isolated curcuminoid pigments	43
II.1	Microrganismos utilizados nos ensaios de atividade antimicrobiana	47
II.2	Teores de pigmentos curcuminóides nos diferentes produtos da cúrcuma.	50
II.3	Atividade antimicrobiana <i>in vitro</i> (método de difusão em ágar) do óleo essencial obtido por hidrodestilação	53
III.1	Diferentes tipos e concentrações de reguladores de crescimento utilizados estabelecimento do cultivo de cúrcuma <i>in vitro</i>	61
III.2	Diferentes concentrações de reguladores de crescimento utilizados nos ensaios na indução de calos e raízes durante cultivo <i>in vitro</i> da cúrcuma em meio MS	63
III.3	Gradiente de temperatura empregado nas análises das substâncias voláteis por CG-FID do óleo essencial e de calos e raízes de cúrcuma	66
III.4	Influência dos meios de cultivo MS e B5 e de reguladores de crescimento no estabelecimento das gemas de cúrcuma <i>in vitro</i>	67
III.5	Influência de diferentes reguladores de crescimento no desenvolvimento de brotos a partir das gemas de cúrcuma em meio MS	68
III.6	Composição centesimal e teores de pigmentos curcuminóides e de óleos essenciais da cúrcuma em pó obtida da planta propagada <i>in vitro</i> em meio MS contendo 3,0 mg/L BAP	70
III.7	Influência dos reguladores de crescimento na indução de calos e raízes de cúrcuma em meio MS	76
III.8	Influência da concentração de KNO ₃ no desenvolvimento de calos de cúrcuma <i>in vitro</i> em meio MS contendo diferentes concentrações de ANA .	77
III.9	Influência da concentração de KCl e do regulador de crescimento ANA no desenvolvimento de calos de cúrcuma <i>in vitro</i> em meio MS	77
III.10	Influência da concentração de KNO ₃ no desenvolvimento de raízes de cúrcuma <i>in vitro</i> em meio MS contendo diferentes concentrações de ANA	79

III.11	Influência da concentração de KCl no desenvolvimento de raízes de cúrcuma <i>in vitro</i> em meio MS contendo diferentes concentrações de ANA	81
III.12	Influência da concentração de KNO ₃ nos teores de pigmentos curcuminóides em calos produzidos em meio MS na presença de três concentrações do regulador de crescimento ANA	83
III.13	Influência da concentração de KCl nos teores de pigmentos curcuminóides em calos produzidos <i>in vitro</i> em meio MS na presença de três concentrações do regulador de crescimento ANA	85
III.14	Influência da concentração de KNO ₃ nos teores de pigmentos curcuminóides em raízes produzidas em meio MS na presença de três concentrações do regulador de crescimento ANA	86
III.15	Influência da concentração de KCl nos teores de pigmentos curcuminóides em raízes produzidas em meio MS na presença de três concentrações do regulador de crescimento ANA	87
III.16	Influência da concentração de KNO ₃ no perfil cromatográfico dos óleos essenciais de calos produzidos por cúrcuma <i>in vitro</i> em meio MS contendo três concentrações do regulador de crescimento ANA.....	91
III.17	Influência da concentração de KCl no perfil cromatográfico dos óleos essenciais de calos produzidos de cúrcuma <i>in vitro</i> em meio MS contendo três concentrações do regulador de crescimento ANA.....	93
III.18	Influência da concentração de KNO ₃ no perfil cromatográfico dos óleos essenciais em raízes produzidas por cúrcuma <i>in vitro</i> em meio MS contendo três concentrações do regulador de crescimento ANA	96
III.19	Influência da concentração de KCl no perfil cromatográfico dos óleos essenciais de raízes produzidas em meio MS contendo três concentrações do regulador de crescimento ANA.....	98

LISTA DE FIGURAS

1	Estruturas químicas dos pigmentos curcuminóides	21
2	Biossíntese da curcumina.....	22
3	Pigmentos obtidos da reação curcumina-ácido bórico	23
4	Compostos comumente encontrados nos óleos essenciais da cúrcuma ...	24
I.1	The chemical structures of the curcuminoid pigments	34
I.2	HPLC analysis of the isolated pigments.....	40
I.3	Wavelength of maximum absorption of curcuminoid pigments in ethanol	40
II.1	Perfil cromatográfico dos pigmentos isolados da cúrcuma: curcumina, desmetoxicurcumina e bisdesmetoxicurcumina.....	50
II.2	Perfil cromatográfico dos compostos voláteis do óleo essencial da cúrcuma obtidos por hidrodestilação em aparelho de Clevenger	52
III.1	Fluxograma para estudo da influência do meio de cultura MS e B5 e de reguladores de crescimento no estabelecimento das gemas de cúrcuma <i>in vitro</i>	60
III.2	Etapas do cultivo da cúrcuma <i>in vitro</i> : brotos utilizados para a retirada do explante (1); plântula no meio de cultivo (2); manipulação da plântula para distribuição entre os meios avaliados (3); plântulas desenvolvidas após 60 dias (4).....	62
III.3	Desenvolvimento obtido das combinações e concentrações dos reguladores – benzilaminopurina (BAP) e o ácido naftaleno acético (ANA) e cinetina (CIN) na otimização do estabelecimento de gemas: 1,0 mg/L benzilaminopurina - BAP (1); 3,0 mg/L BAP (2); 1,0:1,0 mg/L, BAP:ANA(3); 1,0:1,0 mg/L, BAP:CIN (4).....	69
III.4	Etapas do cultivo em solo da cúrcuma: plântula obtida no cultivo <i>in vitro</i> (1); cultivo dos brotos em vasos manutenção na casa de vegetação para aclimação (2) e cultivo no solo (3 e 4).....	71
III.5	Estrutura dos rizomas colhidos (1) e (2); pó obtido após o processamento dos rizomas (3).....	72
III.6	Perfil cromatográfico dos pigmentos curcuminóides extraídos da cúrcuma em pó obtida de rizomas da cultura estabelecida <i>in vitro</i>	73
III.7	Perfil cromatográfico dos óleos essenciais extraídos da cúrcuma estabelecida <i>in vitro</i>	74
III.8	Aspecto do calo obtido do cultivo de explante em meio MS e regulador de crescimento ANA (1) e a Seqüência com diferentes concentrações de ANA 1,0 (2a); 2,0(2b) e 3,0 mg/L(2c)	75
III.9	Raízes obtidas do cultivo de explante em meio MS(1) e Regulador de crescimento ANA no cultivo <i>in vitro</i> e aspecto da raízes (2).....	75
III.10	Calos obtidos no cultivo <i>in vitro</i> da cúrcuma utilizando diferentes concentrações de KNO ₃ e três concentrações de ANA.....	78
III.11	Raízes obtidas do cultivo " <i>in vitro</i> " utilizando diferentes concentrações de KNO ₃ em meio MS contendo três diferentes concentrações de ANA.....	80

III.12	Raízes obtidas do cultivo “ <i>in vitro</i> ” utilizando diferentes concentrações de KCl em meio MS contendo três diferentes concentrações de ANA.....	82
III.13	Proporção de pigmentos curcuminóides encontrados em calos de cúrcuma formados <i>in vitro</i> na presença de diferentes concentrações de KNO ₃ em meio MS contendo três concentrações do regulador de crescimento	84
III.14	Proporção de pigmentos curcuminóides encontrados em calos de cúrcuma formados <i>in vitro</i> na presença de diferentes concentrações de KCl em meio MS contendo três concentrações de ANA.....	85
III.15	Proporção de pigmentos curcuminóides encontrados em raízes de cúrcuma formadas <i>in vitro</i> na presença de diferentes concentrações de KNO ₃ em meio MS contendo três concentrações do regulador de crescimento ANA	87
III.16	Proporção de pigmentos curcuminóides encontrados em raízes de cúrcuma formadas <i>in vitro</i> na presença de diferentes concentrações de KCl em meio MS contendo três concentrações do regulador de crescimento ANA	88
III.17	Perfis cromatográficos de óleos essenciais de calos de cúrcuma obtidos em meio MS na presença de três concentrações (1,0; 2,0; e 3,0 mg/L) do regulador de crescimento ANA.	89
III.18	Perfis cromatográficos de óleos essenciais de calos de cúrcuma obtidos em MS com diferentes concentrações de KNO ₃ na presença do regulador de crescimento ANA na concentração de 2,0 mg/L.....	90
III.19	Perfis cromatográficos de óleos essenciais dos calos de cúrcuma obtidos em meio MS na presença de diferentes concentrações de KCl e do regulador de crescimento ANA na concentração de 2,0 mg/L.	92
III.20	Perfis cromatográficos de óleos essenciais de raízes de cúrcuma obtidas em meio MS na presença de três concentrações (1,0; 2,0; e 3,0 mg/L) do regulador de crescimento ANA...../.....	94
III.21	Perfis cromatográficos de óleos essenciais de raízes de cúrcuma obtidos em meio MS na presença de diferentes concentrações de KNO ₃ e do regulador de crescimento ANA na concentração de 2,0 mg/L.....	95
III.22	Perfis cromatográficos de óleos essenciais de raízes de cúrcuma obtidos em meio MS com diferentes concentrações de KCl, na presença do regulador de crescimento ANA na concentração de 2,0 mg/L.	97

LISTA DE ABREVIATURAS

ANA	Ácido Naftaleno Acético
BAP	Benzilaminopurina
CIN	Cinetina
CG	Cromatografia Gasosa
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
MS	Murashige -Skoog
B5	Gamborg

RESUMO

A separação de pigmentos curcuminóides foi obtida por cristalização da curcumina e por cromatografia em coluna de sílica gel 60G. Estes foram caracterizados quanto ao ponto de fusão, cor, perfil por CLAE, IV, UV e RMN de ^1H e ^{13}C . Dentre os extratos etanólicos da cúrcuma e dos pigmentos, apenas a bisdesmetoxicurcumina inibiu o crescimento do *B subtilis*, sendo a concentração maior que a do antibiótico cloranfenicol. O óleo essencial da cúrcuma inibiu o crescimento do *B. subtilis*, *S. choleraesuis*, *E. coli*, *A. niger* e *S. cerevisiae*, sendo a inibição maior comparada a antibióticos tradicionais. O estabelecimento da cultura de células de cúrcuma *in vitro* foi otimizado em meio Murashige-Skoog (MS) contendo benzilaminopurina (3,0 mg/L). As plântulas obtidas e cultivadas em solo forneceram maior rendimento de cúrcuma em pó e maiores teores de pigmentos curcuminóides, óleos essenciais, proteínas e lipídeos. A incorporação do ácido naftaleno-acético (ANA) no meio MS foi indispensável para indução de calos e raízes. O desenvolvimento dos calos foi favorecido ao adicionar KNO_3 e o de raízes com a adição de KCl.

Palavras-chave: cúrcuma, pigmentos curcuminóides, caracterização, óleos essenciais, atividade antimicrobiana, cultivo *in vitro*, calos, raízes, metabólitos.

ABSTRACT

EVALUATION OF THE CHARACTERIZATION OF *Curcuma longa* L. PIGMENTS, ANTIMICROBIAL ACTIVITY, *IN VITRO*, MORPHOGENESIS IN THE PRODUCTION OF CURCUMINOID PIGMENTS AND ESSENTIAL OILS.

Curcuminoid pigments were separated by curcumin crystallization followed by column chromatography on silica gel 60G. The pigments were characterized by physical data, including according to melting point, color, profile HPLC, IR, UV and ^1H e ^{13}C -NMR. Among ethanolic extracts of turmeric and pigments, only bisdemethoxycurcumin inhibited *B. subtilis*, at a higher ratio compared to chloramphenicol. The essential oil inhibited *B. subtilis*, *S. choleraesuis*, *E. coli*, *A. niger* and *S. cerevisiae*, at a higher ratio compared to traditional antibiotics. The development of turmeric cells *in vitro* was optimized in Murashige-Skoog (MS) containing benzylaminopurine (3.0 mg/L). The plantules obtained when cultivated in soil provided higher yield of ground turmeric and higher levels of curcuminoid pigments, essential oils, proteins and lipids. The addition of naphthalene acetic acid (NAA) to MS was necessary for the induction of callus and roots. The development of callus and roots was favored by adding KNO_3 and KCl, respectively.

Key-words: turmeric, curcuminoid pigments, chemical characterization, essential oils, antimicrobial activity, *in vitro* growth, callus, roots, metabolites.

INTRODUÇÃO

A cúrcuma, também conhecida como açafrão, açafrão da terra, gengibre dourado e mangarataia, é a planta de nome científico *Curcuma longa* L., pertencente à família Zingiberaceae. Trata-se de um arbusto perene, nativo do sul e sudoeste asiático e extensivamente cultivado na Índia, principalmente em Madras, Bengal e Bombay, e também na China, Taiwan, Japão, Burma, Indonésia, e no continente Africano (GOLDWYN, 1997; SCARTEZZINI & SPERONI, 2000). A cultura foi introduzida no Brasil nos anos 80, resultando em boa produtividade – 12 a 15 ton/ha.

A cúrcuma possui *flavor* característico, aroma picante e sabor amargo são classificados como especiaria na maioria das classificações encontradas (AOAC, 1995). Contém, em maior proporção, o amido e em menor quantidade proteína, lipídeos e fibra, além dos pigmentos curcuminóides e dos óleos essenciais. São três os pigmentos curcuminóides - curcumina, desmetoxicurcumina e bisdesmetoxicurcumina - presentes no rizoma nas concentrações de 60, 22 e 18%, respectivamente (GOVINDARAJAN, 1980). Os principais componentes dos óleos essenciais são turmerona, dehidroturmerona e cetonas aromáticas (zingibereno, alfa-felandreno, sabineno, cineol e borneol) em menores proporções (VIASAN et al., 1989; MATA et al., 2004).

São três os produtos da cúrcuma disponíveis no mercado: a cúrcuma em pó, a oleoresina e a curcumina purificada. Estes têm sido utilizados como corante vegetal para colorir alimentos e bebidas, como condimento, como flavorizante e como medicamento (MARTINS & RUSIG, 1992, MESA et al., 2000).

O interesse pela cúrcuma tem aumentado significativamente nos últimos anos. Isto se deve ao fato de ser um produto natural e possuir características de cor semelhantes às da tartrazina, corante amarelo sintético muito utilizado na indústria alimentícia e farmacêutica, que tem provocado reações adversas ao homem (SAFFORD & GOODWIN, 1985; GOLDWYN, 1997; SOMASUNDARAM et al., 2002). Além disto, a cúrcuma é bastante conhecida e explorada pela medicina asiática tradicional, sendo amplamente utilizada como digestivo, carminativo, anti-espasmódico, antioxidante, anti-diarréico, diurético, excitante, nas doenças do fígado, como tônico no tratamento de úlceras, no tratamento de tosses e resfriados comuns e, externamente, como pomada na cicatrização de feridas (GOVINDARAJAN, 1980; AMMON & WAHL, 1991; RAMIREZ-BOSCÁ et al., 1995; DUKE, 1997; SHOBA et al., 1998, GUL et al., 2004).

Vários estudos têm confirmado as atividades antioxidantes, antiinflamatórias, antimicrobianas e anticancerígenas da cúrcuma (ASAI et al., 1999; GUL et al., 2004). A maioria dos trabalhos descritos na literatura atribui efeitos nutracêuticos aos pigmentos curcuminóides. Entretanto, neste foram utilizados a cúrcuma em pó ou a curcumina obtidas comercialmente, ambas possuindo os três pigmentos curcuminóides. Além disso, a cúrcuma em pó possui óleos essenciais. Entretanto, trabalho realizado por NAGABHUSHAN et al. (1988) indicou ser a bisdesmetoxicurcumina o pigmento curcuminóide com maior atividade nutracêutica. Todavia, existem controvérsias, sobre os componentes responsáveis por estas atividades, pois não se sabe se estas propriedades são oriundas de uma ação sinérgica dos pigmentos ou ainda, dos óleos essenciais presentes no rizoma.

Estudos são necessários para investigar as melhores condições para a obtenção de pigmentos e óleos essenciais, e ainda qual dentre eles isoladamente apresenta maior potencial nutracêutico. Uma vez estabelecido o pigmento ou componente do óleo essencial com maior atividade biológica, pesquisas podem ser realizadas com o objetivo de aumentar a produção deste metabólito no rizoma. Atualmente existe uma tendência em se aumentar e otimizar o conteúdo de determinados nutrientes ou princípios ativos em produtos agrícolas. Isto pode ser alcançado através de cultura de tecidos e de tratamentos culturais, sendo mantido com a utilização de um processamento adequado (NARAYANASWAMY, 1988; PIETSCH, 1998).

Através da propagação da planta por cultura de tecidos é possível a incorporação de substâncias nutritivas para promover a multiplicação das células, potencializar o desenvolvimento das plântulas, permitir a produção de mudas com qualidade fitossanitária, e permitir ainda a produção seletiva e aumentada de determinados metabólitos (LOPES & BARBOSA, 1988). Pode-se, também, desenvolver estudos no sentido de incorporar elementos nutritivos visando o aumento da concentração de pigmentos ou de um pigmento curcuminóide específico no rizoma visando à obtenção de maior quantidade de princípios ativos em uma mesma planta.

REVISÃO DA LITERATURA

1. CARACTERÍSTICAS BOTÂNICAS DA CÚRCUMA

A *Curcuma* é de cultivo fácil e apresenta a vantagem de não exigir tratamentos culturais especiais, desenvolvendo-se bem em diversas condições tropicais, em altitudes que variam do nível do mar a 1500 m, em temperaturas de 20 a 30 °C, sob regime pluvial de 1500 mm ou mais por ano ou sob irrigação (GOVINDARAJAN, 1980; SCARTEZZINI & SPERONI, 2000).

A planta apresenta folhas grandes oblongo-lanceoladas e oblíquo-energadas de coloração verde clara, que exalam um odor agradável. A parte aérea é ereta e pode atingir, de acordo com as condições do solo e clima, até 120 cm de altura na fase adulta contendo em cada planta geralmente 5 a 7 folhas. O pseudocaule é formado na base da planta pelo agrupamento das folhas que possuem pecíolos tão compridos quanto os limbos (CORREA, 1975; HERTWIG, 1986; CECÍLIO FILHO, 1996; PÉRET-ALMEIDA, 2000).

A cúrcuma é facilmente reconhecida pela inflorescência em espiga formada por brácteas amarelo claras dispostas em espiral que compõem os cachos. A floração ocorre geralmente 180 dias após o plantio (GOVINDARAJAN, 1980; ESPINOSA et al., 1994).

O sistema radicular é composto de um rizoma primário, o bulbo central ou pião e os rizomas secundários, os dedos. Estes possuem cerca de 8 a 12 cm (central) e 4 a 6 cm (secundários) de comprimento, respectivamente, variando de acordo com as condições de propagação e cultivo. Os rizomas são tuberosos de centro arredondado com laterais alongadas. Possuem uma coloração alaranjada quando novos e escurecem com o passar do tempo. Cresce abaixo do colo da planta, agrupados formando uma estrutura denominada mão (MAIA, 1991; TAINTER & GRENIS, 1996; SCARTEZZINI & SPERONI, 2000).

A propagação da cúrcuma é assexuada ou vegetativa, existindo duas formas de condução: pelo plantio diretamente no solo, sendo o bulbo plantado no local onde será efetivado o desenvolvimento da planta, ou através de sementeira, no qual os bulbos destacados do rizoma central são tratados com bactericida e pré-germinados. No período de 15 a 30 dias desenvolvem mudas vigorosas e uniformes até a formação de mudas com uma a duas folhas quando será transplantado para o solo definitivo (DONALISIO, 1980).

No Brasil, a cúrcuma se adaptou bem, sendo cultivada principalmente nos estados de Goiás, Mato Grosso e São Paulo. A produtividade nacional é de 12 ton/ha, entretanto, em estudos feitos na Universidade Federal de Lavras, obteve-se 25 ton/ha utilizando técnicas adequadas de plantio, dentre elas, espaçamento de 40 cm entre plantas e adubação com nitrogênio, fósforo e potássio (CECÍLIO FILHO, 1996).

2. COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA CÚRCUMA

A composição química dos rizomas de cúrcuma é influenciada por fatores como planta matriz, tipo de solo, clima, adubação, disponibilidade hídrica, época de colheita (primeiro ou segundo ciclo), tempo de armazenamento, dentre outros (OLIVEIRA et al., 1992; SCARTEZZINI & SPERONI, 2000).

Na tabela 1 está resumida a composição centesimal da cúrcuma cultivada no Brasil e na Índia. De um modo geral, o amido é o componente presente em maior proporção (25 a 50%), seguida de proteína (4 a 10%), fibras e cinzas (2 a 7%).

Tabela 1. Composição centesimal de rizomas da cúrcuma originária do Brasil e da Índia

Componentes	Teores (g/100 g)		
	Índia ¹	Brasil ²	Brasil ³
Umidade	-	-	74,70
Proteína	6 a 11	7,01	11,68
Extrato etéreo	-	8,51	7,20
Amido	30 a 50	39,9	35,30
Fibra	-	7,22	5,50
Cinzas	2 a 6	7,81	6,44
Açúcares redutores	-	-	1,25
Açúcares não redutores	-	-	0,57
Extrato não nitrogenado	-	-	69,17

Fontes: ¹GOVINDARAJAN (1980); ²SOUZA & GLÓRIA (1998); ³CECÍLIO FILHO et al. (2000).

A cúrcuma possui também componentes como os pigmentos curcuminóides e óleos essenciais (GOVINDARAJAN, 1980). Amostras provenientes de vários municípios do estado de Minas Gerais apresentaram os teores apresentados na Tabela 2 para estes constituintes da cúrcuma (SOUZA & GLÓRIA, 1998), os quais são semelhantes aos encontrados por GOVINDARAJAN (1980) em produtos de origem indiana.

Tabela 2. Pigmentos curcuminóides e óleo essencial da cúrcuma originária do Brasil e da Índia

Origem	Pigmentos curcuminóides (mg/100 g)	Óleo essencial (mg/100 g)
Brasil ¹	4,41	3,07
Índia ²	5,0	5,8

¹ SOUZA & GLÓRIA (1998); ² GOVINDARAJAN (1980).

2.1. PIGMENTOS CURCUMINÓIDES

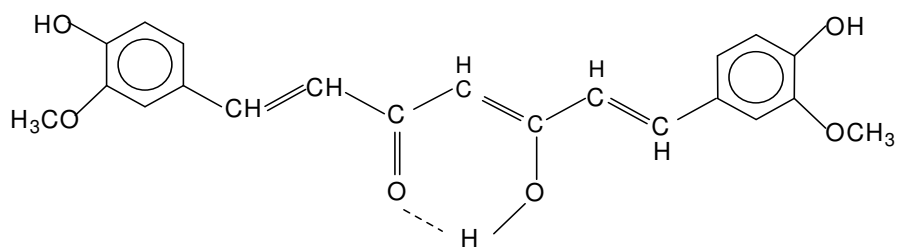
O rizoma da cúrcuma pode conter até 4 a 8 mg/100 g de pigmentos curcuminóides. As variações nos teores de pigmentos são devidas às diferentes variedades ou cultivares, ao período do desenvolvimento do bulbo e às práticas culturais (MATHAI, 1976). Com relação ao tempo de cultivo do rizoma foi observado um aumento no teor dos pigmentos curcuminóides se mantido por mais tempo no solo (GOVINDARAJAN, 1980).

MANGALAKUMARI et al. (1986) localizaram as células isoladas e circulares situadas entre as células hialinas que retêm os pigmentos curcuminóides. Nos rizomas jovens estas células estão localizadas na região mais externa do rizoma, enquanto que no maduro, um número maior destas células se concentra na região central do rizoma.

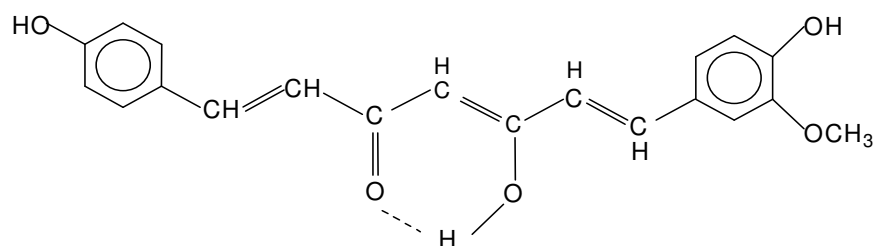
2.1.1. Características físico-químicas

Os três pigmentos curcuminóides encontrados na cúrcuma são análogos estruturalmente, e pertencem à classe diferoluilmetano (C₂₁H₂₀O₆). A curcumina, 1,7-bis-(hidroxi-3-metoxifenil)-1,6-heptadieno-3,5-diona, possui dois grupos metoxila (OCH₃), a desmetoxicurcumina apenas um, e a bisdesmetoxicurcumina nenhum (Figura 1). Estes pigmentos estão presentes em concentrações que variam de 4 a 6 mg/100 g para curcumina; de 4 a 3 mg/100 g para desmetoxicurcumina, e de 3 a 2 mg/100 g para a bisdesmetoxicurcumina (MARTINS & RUSIG, 1992).

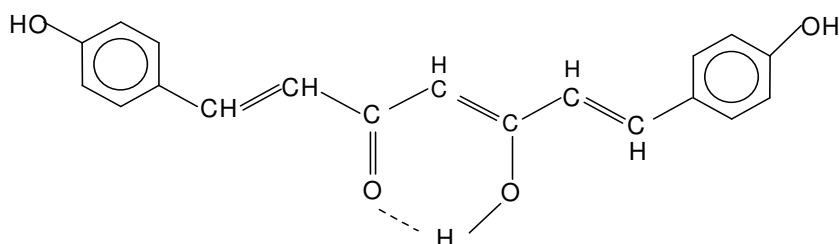
A curcumina, desmetoxicurcumina e bisdesmetoxicurcumina apresentam absorções máximas no espectro do ultra violeta, nos comprimentos de onda de 429, 424 e 419 nm. Os pigmentos curcuminóides apresentam fluorescência amarela sob luz ultravioleta. O espectro de fluorescência apresenta excitação a 434 nm e emissão a 520 nm (SOUZA, 1993; PÉRET-ALMEIDA et al., 2005).



Curcumina



Desmetoxicurcumina



Bisdesmetoxicurcumina

Figura 1. Estruturas químicas dos pigmentos curcuminóides.

2.1.2. Síntese

Os pigmentos curcuminóides são biosintetizados a partir do ácido cinâmico, via ácido chiquímico. A conversão do ácido chiquímico para ácido cinâmico, em plantas, requer a formação intermediária de fenilalanina. A ação da fenilalanina amonialiase sobre a fenilalanina dá origem ao ácido cinâmico que sofre uma metilação formando o ácido ferúlico.

Numa reação de condensação, duas moléculas do ácido ferúlico com grupos acetil e malonil, dão origem ao pigmento curcuminóide. Esta condensação requer a participação da coenzima A, conforme indicado na Figura 2 (ROUGHLEY & WHITING, 1973; SANTOS et al., 2000).

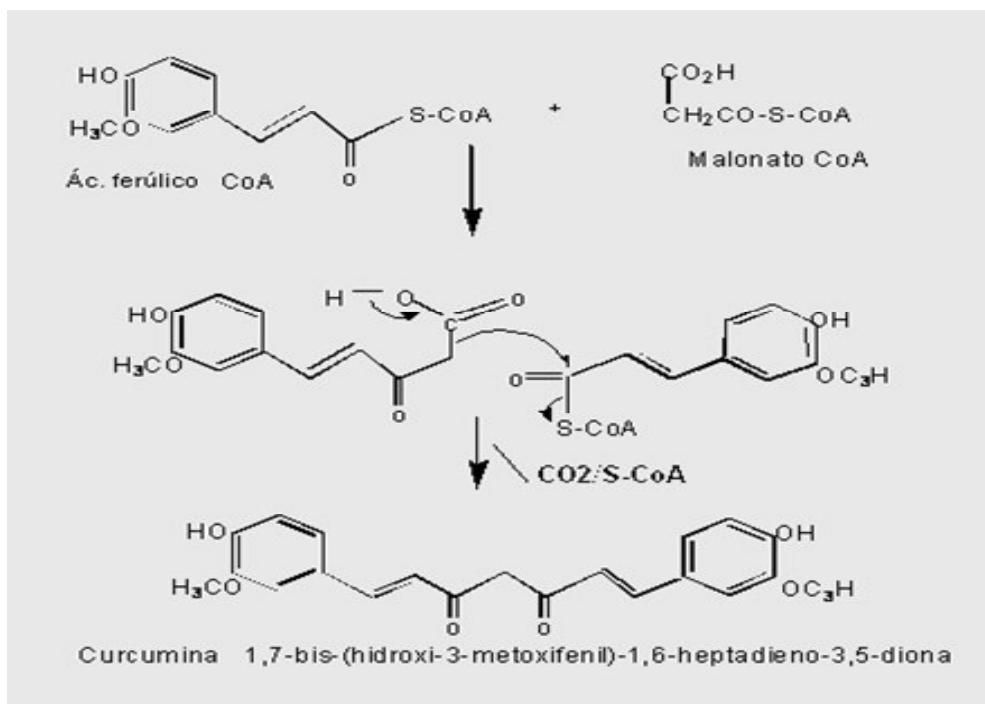


Figura 2. Biosíntese da curcumina (ROUGHLEY & WHITING, 1973).

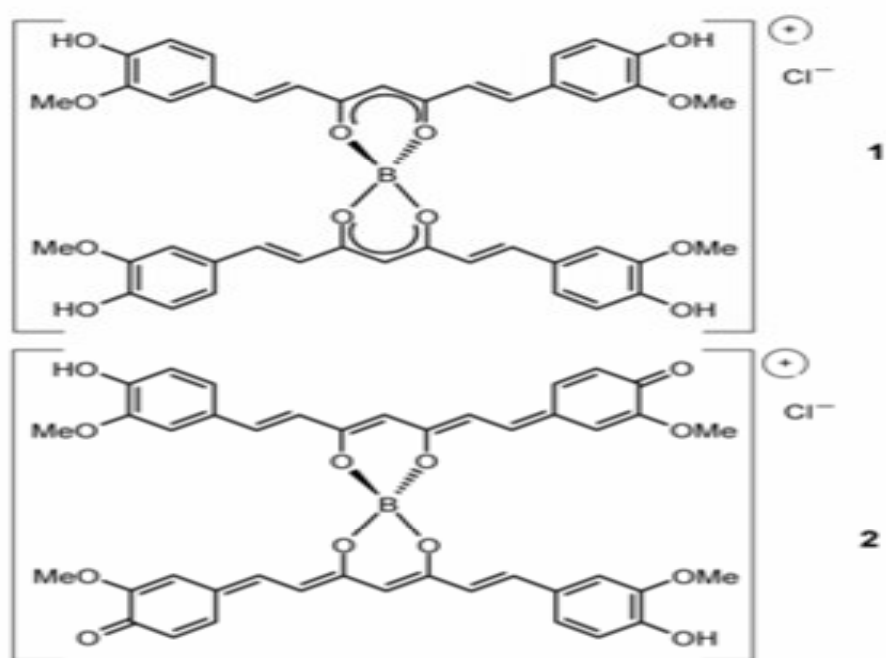
2.1.3. Extração, separação e quantificação

Várias técnicas têm sido utilizadas para a separação dos pigmentos curcuminóides, dentre elas, a cromatografia de camada delgada (CDD) e a cromatografia em coluna (CC). Na separação por CCF, a fase estacionária mais utilizada foi sílica gel com vários tipos de fases móveis, tais como benzeno: acetato de etila, 70:30 (GOVINDARAJAN, 1980), benzeno:metanol, 80:6 (KRISHNAMURTHY et al., 1976), 5% de metanol em clorofórmio (JITOE et al., 1992; OSAWA et al., 1995).

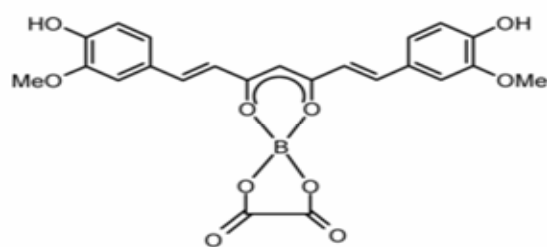
SRINIVASAN (1953) separou os três pigmentos curcuminóides utilizando a CC em sílica gel e benzeno: água (80:20) como fase móvel. AMARAL (2000) separou a curcumina dos demais pigmentos curcuminóides utilizando uma coluna (55 x 1,3 cm de comprimento e diâmetro, respectivamente) de sílica gel (Kieselgel 60 ref. 1009385 partículas de 230 a 400 mesh) e a fase móvel tolueno:acetato de etila (93:7) sob baixa pressão (0,5 bar).

Um método mais rápido para a separação dos pigmentos seria a cromatografia líquida de alta eficiência – preparativa. Esta metodologia oferece solução a problemas de decomposição fotoquímica e oxidativa. Entretanto, não foi encontrada na literatura consultada informação sobre sua utilização na separação e purificação de pigmentos curcuminóides.

O método mais utilizado para detectar a presença de curcumina em produtos alimentícios baseia-se na reação com o ácido bórico, a qual gera dois compostos de coloração vermelha a rubrocurcumina e rosocianina (TAKAHASHI, 1987). Representadas na Figura 3, a fórmula 1 representa a Rosocianina formada por um complexo catiônico denominado dicurcuminato de boro aqui apresentada com um íon cloro. A estrutura investigada mostra que a carga é distribuída por toda a molécula conforme indicada na formula 2. Na rosocianina as duas moléculas de curcumina não estão dentro do mesmo plano, mas são torcidas entre si. O mesmo aplica-se a rubrocurcumina.



Rosocianina



Rubrocurcumina

Figura 3. Pigmentos obtidos da reação do curcumina com o ácido bórico.

A quantificação do teor de pigmentos curcuminóides usualmente é feita, após a extração da amostra com etanol por refluxo, por leitura da absorbância a 425 nm em espectrofotômetro (TAKAHASHI, 1987). Esta determinação fornece a concentração de pigmentos totais.

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) tem sido empregada para a separação, identificação e quantificação dos pigmentos curcuminóides. TALLON-NETTO (2004) utilizou a mesma fase estacionária, entretanto obteve melhores resultado com a fase móvel etanol:água (90:10) e fluxo de 0,4 mL/min na determinação dos pigmentos curcuminóides de cúrcuma em pó.

2.2. ÓLEOS ESSENCIAIS

2.2.1. Características físico-químicas

O conteúdo de óleos essenciais nos rizomas de cúrcuma varia de 2,5 a 7%. A extração pode ser feita por destilação ou extração com solvente apolar do rizoma fatiado. A coloração do óleo essencial varia de amarelo pálido a amarelo alaranjado, com odor característico (KRISHNAMURTHY et al., 1976; VIASAN et al., 1989; LEUNG & FOSTER, 1996). Os principais compostos estão relacionados na figura 4.

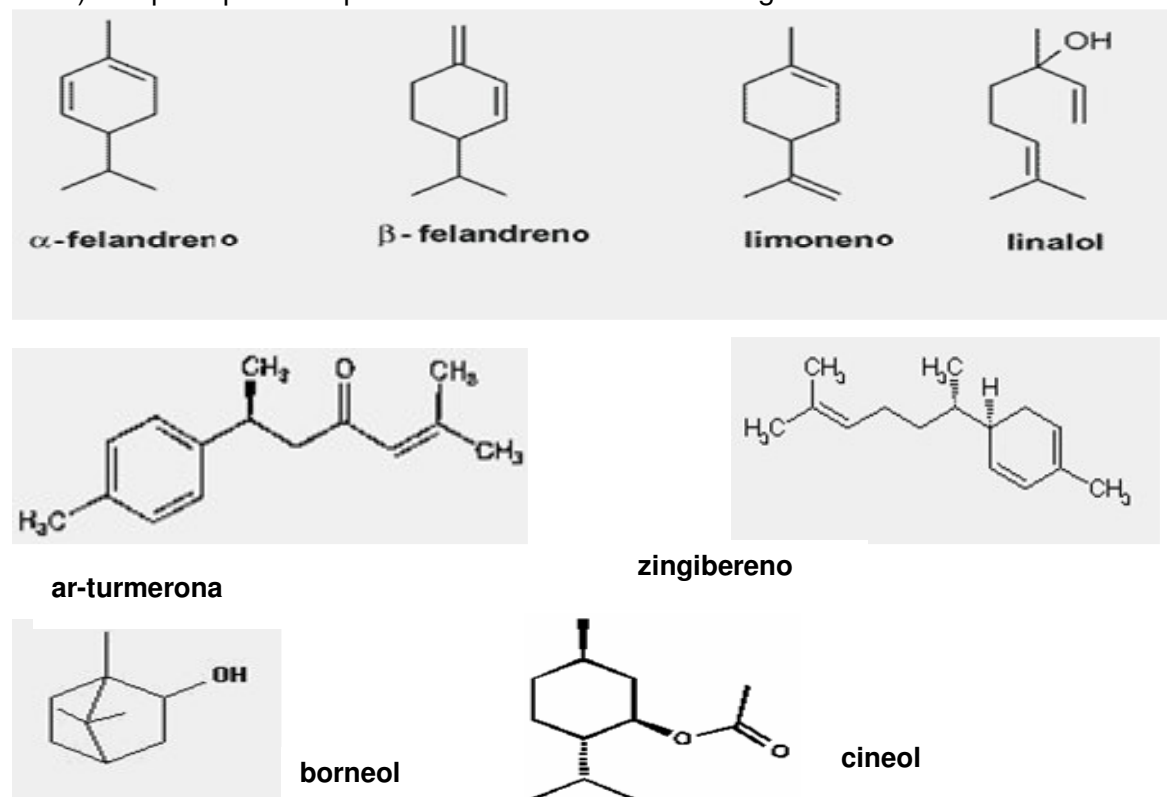


Figura 4. Compostos encontrados nos óleos essenciais no rizoma da *Curcuma longa*.

O óleo essencial é constituído por álcoois sesquiterpênicos e cetonas, produtos secundários do metabolismo vegetal. A síntese ocorre nas células glandulares ou epiteliais. O óleo fica retido em vacúolos situados no citoplasma. Quando estes são rompidos por danos mecânicos ou físico-químicos, os óleos essenciais ficam livres. Apresenta um baixo ponto de ebulição e um forte aroma (HESS, 1975). Os principais componentes dos óleos essenciais são turmerona (35%), ar-turmerona (12%), α e β -zingibereno (25%), 1-8 cineol (1%), α -felandreno (1%), sabineno (0,6%) e borneol (0,5%) (VIASAN et al., 1989; OHSHIRO et al., 1990; MATA et al., 2004; JAYAPRASKASHA et al., 2005).

2.2.2 Síntese

A condensação de uma unidade da acetoacetil-CoA a uma molécula de acetil-CoA seguida de uma condensação aldólica, gera 3-hidroxi,3-metilglutaril-CoA, o qual é reduzido gerando o mevalonato. Este, por sua vez, é convertido em isopentenil-pirofosfato ou isopreno ativo (unidade básica de formação dos terpenos e esteróides). Os isoprenos (C_5H_8) são as unidades moleculares que dão origem aos terpenos (SANTOS et al., 2000). Rizomas frescos de *Curcuma xanthorrhiza* Roxb. Foram investigados quanto aos teores de terpenoides. Foram encontrados alguns sesquiterpenos, α -curcumene, ar-turmerona, xantorrizol, germacrona, β -curcumeno, β -sesquifelandreno, curzerenone (10), α -turmerona e β -turmerone identificados por capilaridade em GC-MS (UEARA et al., 1992).

2.2.3. Extração

Os métodos utilizados para o isolamento do óleo essencial de cúrcuma são tradicionalmente a hidrodestilação e a extração com hexano. Estes são os mais empregados por serem simples, de baixo custo, sendo muito utilizados na extração de voláteis (SIMÕES et al., 2000).

Como matéria prima, pode ser utilizado o rizoma cru e fatiado, fatiado e seco ou ainda em pó para facilitar a penetração do solvente e a remoção dos óleos (GOVINDARAJAN, 1980). Com o hexano, a mistura com a cúrcuma é mantida sob agitação durante um período de tempo, filtrada a vácuo e concentrada em evaporador rotatório a 60 °C e, posteriormente, armazenada sob refrigeração. Na extração por hidrodestilação, a amostra pesada é colocada com água em um balão de 1000 mL e

levada ao aquecimento em manta aquecedora. A obtenção do óleo ocorre em aparelho de Clevenger. O óleo essencial é coletado do condensador e armazenado sob refrigeração (SINGH et al., 2002b).

3. PROPRIEDADES NUTRACÊUTICAS DA CÚRCUMA

Além de ser conhecida por suas propriedades corantes e flavorizantes, a cúrcuma tem sido utilizada há 6.000 anos pela medicina Ayurveda, tradicional na Índia, a qual emprega substâncias naturais. É usualmente utilizada no tratamento de doenças da pele, distúrbios estomacais, doenças do fígado e em resfriados com comprometimento das vias nasais (AMMON & WAHL, 1991). Ainda na medicina indiana, a cúrcuma tem sido utilizada como antiinflamatório, antiartrítico, regulador das funções biliares e redutor do nível de colesterol (DUKE, 1997; GOLDWYN, 1997; CECÍLIO FILHO et al., 2000).

Através de estudos desenvolvidos utilizando extratos do rizoma da cúrcuma foram identificadas atividades antioxidante, antimicrobiana, antiinflamatória e anticancerígena (GOVINDARAJAN, 1980; RAMIREZ-TORTOSA et al., 1998; LEE et al., 2003). SAN LIN (1994) avaliou a eficiência de extratos de cúrcuma no tratamento de certos distúrbios circulatórios, como angina e coágulos sangüíneos originários de traumas, de cólicas menstruais e dores relacionadas à insuficiência circulatória.

O poder nutracêutico da cúrcuma pode ser atribuído principalmente aos componentes fenólicos, que exercem efeito antioxidante. Os pigmentos curcuminóides possuem duas hidroxilas fenólicas, sendo um composto β -dicarbonílico, e um grupo dicetona, tendo sido considerados como as principais classes de metabólitos responsáveis pela propriedades nutracêuticas do rizoma da cúrcuma, seguidos dos óleos voláteis: zingibereno, felandreno, cineol, sabineno e borneol (LACHANCE et al., 1997).

3.1. ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

A atividade antimicrobiana da cúrcuma foi relatada por vários autores. De acordo com BHAVANISHANKAR et al. (1979), o extrato alcoólico da curcumina testado *in vitro*, apresentou atividade antimicrobiana frente a *Staphylococcus aureus* na concentração de 2,5 a 50 mg/100 mL. Em testes com *Aspergillus parasiticus*, o extrato alcoólico da cúrcuma também promoveu a inibição de crescimento atuando como fungistático (LUTOMSKI et al., 1974).

KIM et al. (2003) realizaram teste em plantas pulverizando uma suspensão preparada com água, tween 80 e curcumina isolada na concentração de 250 mg/L. Esta mistura, aplicada em plantas infestadas, apresentou atividade antifúngica nas proporções de 85, 76 e 45% para *Phytophthora infestans*, *Puccinia recondita* e *Rhizoctonia solani*, respectivamente.

O óleo essencial obtido por hidrodestilação da cúrcuma foi avaliado sem diluição na inibição de bactérias. Os resultados obtidos, quando comparados ao antibiótico gentamicina (30 µg), foram *Staphylococcus aureus* 36%, *Staphylococcus epidermidis* 90%, *Escherichia coli* 18%, *Pseudomonas aeruginosa* 22%, e *Salmonella typhimurium* 31% (SINGH et al., 2002b).

LEE et al. (2003) verificaram que ar-turmerona isolada da fração hexânica obtida do rizoma, quando testada na concentração de 500 ppm, apresentou atividade frente aos fungos *Phytophthora infestans* e *Erysiphe graminis* presentes em plantas.

Diversos mecanismos já foram identificados como resultantes da ação das substâncias naturais na inibição da atividade microbiana. Um metabólito ou classe de metabólitos seria responsável por esta atividade, ou ainda do sinergismo entre eles com estruturas semelhantes a conservantes conhecidos como eugenol e ácido benzóico (BRUL & COOTE, 1999).

Pesquisas para avaliar a atividade antimicrobiana de diferentes componentes frente a diversos microrganismos podem ser realizadas por meio de estudos comparativos, com microrganismos de interesse na área alimentícia. As culturas bacterianas mais frequentemente estudadas são as bactérias Gram positivo como o *Staphylococcus aureus*, que é responsável por infecções pós-operatórias e alimentares e o *Bacillus subtilis*, cujos esporos são encontrados em alimentos mantidos a altas temperaturas. São também estudadas as bactérias Gram negativo *Salmonella typhimurium* e *Escherichia coli*, do gênero Enterobacteriaceae, presentes no intestino humano e de animais e causadoras de infecções urinárias e septicemia. O fungo mais estudado é o *Saccharomyces cerevisiae*, que é utilizado em bebidas fermentadas para a produção de etanol e na panificação como fermento, mas é também encontrado em vegetais deteriorados. A *Candida albicans* responsável por infecções do trato urinário, e ainda *Aspergillus niger* responsável decomposição negra das frutas e de outros alimentos são também utilizados (COWAN, 1999).

A maioria dos ensaios para avaliar a atividade antimicrobiana, envolve a difusão em ágar, por contato direto da amostra por meio de um cilindro, ou por intermédio de um disco de papel de filtro impregnado com a amostra. Para os ensaios, placas de petri são

preparadas com o meio base e meio de superfície contendo os microrganismos após a solidificação do primeiro (GAVIN, 1957; NUNAN et al., 1985; TAYLOR et al., 1996; GUL et al., 2004).

4. CULTURA DE TECIDOS

Esta técnica possibilita a multiplicação rápida das plantas em curto período de tempo e em espaço reduzido, propicia a obtenção de mudas isentas de doenças bacterianas, viróticas e vasculares, além de um bom rendimento. Tem permitido ainda a uniformização das características como a colheita, época de floração entre outras (SIMÕES et al., 2000).

Para que esses processos ocorram na cultura de células, o meio de cultivo é preparado com a adição de água destilada, nutrientes, fitohormônios e esterilizado. A menor porção possível do meristema – explante - é transferida para o meio e é incubado em condições adequadas ao desenvolvimento de plântulas. Quando utilizadas para o plantio, as plântulas darão origem à mudas desenvolvidas na casa de vegetação e, posteriormente, transplantadas para o campo (LOPES & BARBOSA, 1988; DANTAS-BARROS et al., 1993).

A diferenciação das células no cultivo, denominada organogênese, é um expediente também utilizado no cultivo de células, que possibilita a produção isolada de raízes, brotos ou ainda regenerar a planta completamente. A definição dos órgãos da planta formados é potencializada com o auxílio dos fitormônios, auxinas e citocininas adicionadas ao meio de cultivo. Em síntese, este procedimento permite que seja estimulado o cultivo de apenas parte da planta, onde existe a maior concentração das substâncias desejadas (HESS, 1975; SIMÕES et al., 2000).

Vários trabalhos indicaram ser a cúrcuma passível de reprodução por cultura de células. NADGAUDA et al. (1978) obtiveram sucesso na propagação vegetativa de cúrcuma a partir de explantes retirados dos brotos, adicionados ao meio basal Murashige & Skoog (MS) com leite de coco, cinetina (CIN) e benzilaminopurina (BAP). Os brotos alongados foram transferidos para o meio White; com a adição de 2% de sacarose até o desenvolvimento das raízes quando, então, foram transplantadas com sucesso para a casa de vegetação.

BALANCHANDRAN et al. (1990) estabeleceram a cultura de cúrcuma a partir de fragmentos de brotos de cúrcuma em meio basal MS com diferentes concentrações dos fitohormônios BAP e CIN e obtiveram sucesso na propagação e na implantação da cultura no solo. Estes resultados sugerem não ser necessário incorporar o leite de coco ao meio

de cultivo. Além disto, não foi necessária a utilização de um meio de cultura intermediário, antes da transferência ao solo, como sugerido por NADGAUDA et al. (1978).

ANAND et al. (1999) investigaram a influência de diferentes tipos de reguladores de crescimento nas diferentes etapas da propagação. Foi utilizado o meio MS e, para a formação de calos, foram testados os fitormônios 2,4-diclorofenoxiacético – 2,4-D (1,5 mg/L); o ácido naftaleno acético – NAA (1 mg/L) e o BAP (0,5 mg/L). Um aumento proporcional na regeneração dos tecidos foi obtido em meio MS contendo ácido indol acético – IAA (0,5 mg/L) e BAP (1,5 mg/L). O sucesso do estabelecimento desta cultura no solo foi de 80%.

Outros componentes do meio de cultivo que podem ser alterados são os sais minerais. As necessidades durante o cultivo variam com a espécie, a natureza do tecido, o estado fisiológico e o tipo de organogênese da planta (HESS, 1975; MALAVOLTA et al., 1997). Nos meios de cultura são utilizadas quantidades elevadas de minerais, superiores às necessidades efetivas dos tecidos para garantir o sucesso no cultivo. De acordo com MALAVOLTA et al. (1997), os meristemas e, de forma geral, os tecidos com atividade metabólica elevada, podem apresentar elevadas necessidades em potássio, pois este mineral atua na síntese de enzimas como as sintetases, redutases, oxidases, transferases e aldolases.

Uma vez que GOTO (1993) afirmou que, o aumento dos níveis de potássio na adubação promoveu o aumento dos pigmentos curcuminóides nos rizomas, surge a idéia de promover o desenvolvimento *in vitro* de uma estrutura formada por células não diferenciadas, o calo, a partir de um explante, utilizando o meio MS, regulador de crescimento e, sais minerais em concentrações diferentes com o objetivo de estimular a produção de metabólitos secundários como os pigmentos e óleos essenciais.

O desenvolvimento de raízes *in vitro* também foi estudado com os mesmos objetivos. No rizoma da cúrcuma estão concentrados os pigmentos e parte dos óleos essenciais, estes são originados das raízes da planta. A indução da produção de raízes no meio MS, por organogênese direta, com a adição de regulador de crescimento e sais minerais em concentrações diferentes não foi avaliada em estudos anteriores.

A utilização de uma fonte de potássio em meio de cultivo pode estimular a produção de metabólitos secundários, uma vez que está relacionada à produção de enzimas na planta (MALAVOLTA, 1997). Surgiu a proposta da incorporação de sais que contivessem potássio em sua composição. O potássio em quantidades adequadas é conhecido por beneficiar o metabolismo da planta, e o nitrato de potássio (KNO_3), está presente na composição do meio MS utilizado na maioria dos trabalhos de estabelecimento da

cúrcuma *in vitro*. Outro sal poderia ser avaliado, o cloreto de potássio (KCl), este, por sua vez, é essencial para a fotossíntese e é o único anion inorgânico que não é limitado estruturalmente aos metabólitos. O KCl é utilizado na agricultura como fertilizante pois age alterando o potencial osmótico da planta. Esta mudança, modifica a composição nutritiva dos exudatos da raiz no solo que, por sua vez, favorece os microrganismos redutores de manganês, benéficos ao desenvolvimento da planta (PIETSCH, 1998).

De acordo com LAVEE & HOFFMAN (1971), a concentração de íons potássio interfere no desenvolvimento dos calos sendo que a taxa ideal para o desenvolvimento de calo da maçã foi de 3,5 mM de íons potássio (K^+); valores maiores ou menores prejudicaram o crescimento.

Como citado anteriormente estes metabólitos secundários são produzidos pela planta através das reações bioquímicas. Estas condições relacionadas acima também podem alterar a o desenvolvimento de calos e raízes, aspectos que devem ser avaliados neste estudo.

OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivo geral otimizar a produção dos pigmentos curcuminóides e dos óleos essenciais da cúrcuma por meio de cultura de tecidos.

Os objetivos específicos foram:

- (i) separar, purificar e determinar as características físico-químicas dos três pigmentos curcuminóides presentes na cúrcuma, isoladamente;
- (ii) avaliar a atividade antimicrobiana da cúrcuma em pó, da curcumina comercial, dos três pigmentos curcuminóides isolados e do óleo essencial da cúrcuma; e
- (iii) otimizar e estimular a produção de pigmentos curcuminóides e de óleos essenciais em calos e raízes à partir de técnicas de cultura de tecido.

MATERIAL E MÉTODOS

Para o atendimento de cada um desses objetivos o trabalho foi dividido em três capítulos, os quais são apresentados a seguir:

- I. Separação e determinação das características físico-químicas da curcumina, desmetoxicurcumina e bisdesmetoxicurcumina;
- II. Atividade antimicrobiana *in vitro* da cúrcuma em pó, dos pigmentos curcuminóides e dos óleos essenciais;
- III. Estabelecimento de gemas, indução e formação de pigmentos curcuminóides e óleos essenciais em calos e raízes de *Curcuma longa* L. *in vitro*.

Cada um destes capítulos foi elaborado na forma de artigo científico contendo os subitens: Introdução, Material e Métodos, Resultados e Discussão, e Conclusões.

RESULTADOS

CAPÍTULO I

SEPARAÇÃO E DETERMINAÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS FISICO-QUÍMICAS DA CURCUMINA, DESMETOXICURCUMINA E BISDESMETOXICURCUMINA

Apêndice 1 - Artigo já publicado

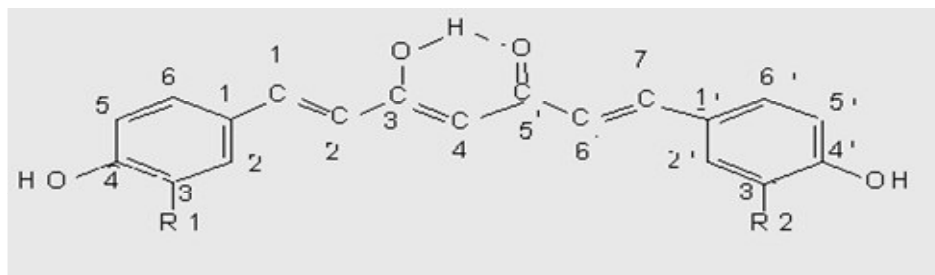
PÉRET-ALMEIDA L; CHERUBINO, A.P.F.; ALVES R.J.; DUFOSSÉ, I.; GLÓRIA, M. B.A.
Separation and determination of the physico-chemical characteristics of curcumin,
demethoxycurcumin and bisdemethoxycurcumin. *Food Research International*, v. 38,
p. 1039 -1044, 2005.

SEPARATION AND DETERMINATION OF THE PHYSICO-CHEMICAL CHARACTERISTICS OF CURCUMIN, DEMETHOXYCURCUMIN AND BISDEMETHOXYCURCUMIN

1. INTRODUCTION

The rhizomes of turmeric (*Curcuma longa* L.), a plant of the Zingiberaceae family, provide a yellow and flavorful powder when dried and ground. Recently, it has been valued worldwide as a functional food because of its health promoting properties (AMMON & WAHL, 1991; JAYAPRAKASHA et al., 2002). There are several reports in the literature indicating a variety of pharmacological activities of turmeric, such as anti-inflammatory, anti-human immunodeficiency virus, antimicrobial, antioxidant, antiparasitic, antimutagenic and anticancer (REDDY & CHANDRAKASAN, 1989; SIMON et al., 1998; AHSAN et al., 1999; MESA et al., 2000; KIM et al., 2001). It is also efficient in the treatment of circulatory problems, liver diseases, and dermatological disorders (TODA et al., 1985; SRINIVASAN et al., 1992; OSAWA et al., 1995; SEMWAL et al., 1997).

The pharmacological activities of turmeric have been attributed to its ethanol extracts, which contain three different curcuminoid pigments (Fig. I.1), curcumin (C)[1,7-bis(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-1,6-heptadiene-3,5-dione], demethoxycurcumin (DMC) [1-(4-hydroxyphenyl)-7-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-1,6-heptadiene-3,5-dione] and bisdemethoxycurcumin (BDMC) [1,7-bis(4-hydroxyphenyl)-1,6-heptadiene-3,5-dione] (BONG, 2000; JAYAPRAKASHA et al., 2002).



Compound	R1	R2
Curcumin	OMe	OMe
Demethoxycurcumin	H	OMe
Bisdemethoxycurcumin	H	H

Fig. I.1. The chemical structures of the curcuminoid pigments.

A variety of methods have been reported for the quantification of curcuminoid pigments. Most of them are spectrophotometric, expressing the total color content of the sample (ASTA, 1985). Commercially available curcumin consists of a mixture of naturally occurring curcuminoids with curcumin as the main constituent (ASHAN et al., 1999, JAYAPRAKASHA et al., 2002). Since the curcuminoid pigments vary in chemical structures, it is possible that the chemical and color characteristics, as well as the functional properties, will vary among the pigments. Pure C is scarce and expensive, whereas DMC and BDMC are not commercially available. Therefore, it is important to obtain pure pigments and to characterize them individually to provide subsidies for the determination of each curcuminoid pigment.

Several studies were undertaken to separate curcuminoid pigments by thin-layer chromatography (TLC) and column chromatography (CC). The stationary phase most used was silica gel 60G with different solvent systems including benzene, ethyl acetate, ethanol, chloroform, acetic acid, hexane and methanol for TLC (JANAKI & BOSE, 1967; KRISHNAMURTHY et al., 1976; GOVINDARAJAN, 1980; JANBEN & GOLE, 1984; OSAWA et al., 1995) and benzene, water, toluene and ethyl acetate for CC (SRINIVASAN et al., 1992). However, poor resolution limited the curcumin bands to 80% purity. Furthermore, no separation was obtained for demethoxycurcumin and bisdemethoxycurcumin.

This study was undertaken to provide information on the physico-chemical characteristics of individual curcuminoid pigments to facilitate their identification in the mixture. The specific objectives were (i) to compare the efficient of different solvent systems for the separation of curcuminoids pigments by TLC; (ii) to develop a methodology for the preparative separation of curcuminoid pigments; (iii) to determine the physico-chemical and color characteristics of the individual curcuminoid pigments.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. MATERIALS

A mixture of curcuminoid pigments from commercial turmeric was obtained from Merck (Darmstadt, Germany). The chemicals used were of reagent grade, whereas HPLC solvents were from Merck (Darmstadt, Germany) chromatographic grade.

2.2. METHODS

2.2.1. Comparison of the efficiency of different solvent systems for the separation of curcuminoids pigments by TLC

The analytical separation of curcuminoid pigments by TLC was investigated using silica gel 60G (Merck, Darmstadt, Germany) plates (4.5 x 10 mm) developed with different solvent systems as indicated in Table I.1. The method was selected according to the R_f values for each pigment. The different solvents were tested for thin layer chromatographic (TLC), including the elution systems ethyl acetate, chloroform, methanol (KRISHNAMURTHY et al., 1976; JANBEN & GOLE, 1984; OSAWA et al., 1995) toluene and ethyl acetate for chromatographic column (CC) (SRINIVASAN et al., 1992).

Table I.1. Different solvent systems on the separation of curcuminoid pigments by TLC

TLC mobile phases	R _f		
	C	DMC	BDMC
Toluene:ethyl acetate (97:3)	0.90	0.86	0.80
Toluene:ethyl acetate (90:10)	0.84	0.80	0.75
Chloroform:methanol (95:5)	0.40	0.34	0.25
Dichloromethane:methanol (99:1)	0.47	0.28	0.16
Dichloromethane:methanol (95:5)	0.53	0.42	0.33

C – curcumin; DMC – demethoxycurcumin; BDMC – bisdemethoxycurcumin.

2.2.2. Isolation of curcuminoids pigments

Curcumin crystallization. Crystallization of the curcumin was performed by dissolving a 500 mg sample in 50 mL of methanol at 60 °C. After dissolution, 10-12 mL of distilled water was added, and the mixture was kept at 5 °C for 2 hr. The curcumin crystals were separated from the mother liquor by vacuum filtration.

CC separation of the pigments from the mother liquor. The mother liquors from the crystallization were combined and dried at 60 °C on a rotary evaporator (Büchi, Switzerland). A 100 mg portion of the dried powder was dissolved in acetone, mixed with silica gel (0.01 g) and subjected to CC on a 85 x 1.3 cm glass column packed with 20 cm Silica gel 60G (Merck, Darmstadt, Germany), 0.063 - 0.200 mesh (RASMUSSEN et al., 2000). The silica was impregnated with a buffer of sodium dihydrogen phosphate

(NaH_2PO_4), and the eluent was dichloromethane. The system has additional advantages in reducing the risk of degradation of the pigments in column. The fractions collected were grouped according to their TLC profile, concentrated under vacuum at 40 °C and analyzed by HPLC.

2.2.3. Physico-chemical characterization of the separated curcuminoid pigments

The separated pigments were analyzed by HPLC, melting point, UV-visible spectrophotometry, infrared spectroscopy, nuclear magnetic resonance, and CIE $L^*a^*b^*$ characteristics.

2.3. METHODS OF ANALYSIS

2.3.1. Determination of curcuminoid pigments by HPLC

The pigments were dissolved in ethanol and filtered through 0.45 μm , 13 mm HVLP membranes (Millipore Corp., Milford, MA, USA), separated by HPLC and quantified using a diode array detector at 425 nm adapted from TALLON-NETTO (2004). A spherical Shim-pack CLC-NH₂ column (5 μm , 4.6 x 150 mm, Shimadzu, Kyoto, Japan) and a ethanol: water (85:15, v/v) mobile phase with a flow rate of 1 mL/min at 22 ± 1 °C were used. The concentration was calculated using the extinction coefficient for each pigment.

2.3.2. Determination of the melting point

The melting point was determined using a melting point apparatus MQAPF-301 Microquímica (São Paulo, SP, Brazil).

2.3.3. UV-visible spectrophotometry

Absorption spectra of the individual pigments in ethanol and ethanol:water (85:15, v/v) were determined on a 106A spectrophotometer (Shimadzu, Kyoto, Japan). Molar and specific absorptivity of each pigment were determined using Beer's law.

2.3.4. Infrared spectroscopy

Each curcuminoid pigment (0.1 mg) was mixed with 100 mg KBr and pressed to form a pellet (LEE et al., 2003) that was analyzed on an IR 400 Spectrophotometer (Shimadzu, Kyoto, Japan).

2.3.5. Nuclear magnetic resonance

Spectra of ^1H and ^{13}C were determined in DMSO-d₆, operating at 200 and 50 MHz, respectively, using a Bruker *AVANCE* DPX200 NMR spectrometer (Rheinstetten, Germany). TMS was used as an internal standard (JAYAPRAKASHA et al., 2002).

2.3.6. CIE L*a*b* characteristics

The CIE (Commission Internationale de l'Eclairage) L*,a*,b* color characteristics of the individual pigments (10 mg) incorporated with acetone in 10 g of silica 60 G were determined using a ColorTec, PCM colorimeter (Accuracy Microsensor Inc., Pittsford, USA). Plain silica was used to calibrate the equipment.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. COMPARISON OF TLC METHODS FOR THE SEPARATION OF CURCUMINOID PIGMENTS

TLC separation of curcuminoid pigments in silica gel using different solvent systems resulted in the R_f values indicated in Table I.1. All of the spots showed fluorescence when observed under UV light. Some of the developing solvents employed did not promote separation of DMC and BDMC better than the system of dichloromethane: methanol in the proportion 99:1. On this system the intervals between pigments is larger and the spots were well defined, providing the best results.

3.2. PREPARATIVE SEPARATION OF CURCUMINOIDS PIGMENTS

3.2.1. Crystallization of curcumin

The first crystallization of the curcuminoid pigments resulted in crystals containing 56.9 % of curcumin and other curcuminoid pigments (Table I.2). Successive crystallizations improved the purity of curcumin; however, there was a loss in yield. In the third successive crystallization, a 40% yield of 92% pure curcumin was obtained with no BDMC detected. Further purification of the crystals was possible by CC.

Table I.2. Influence of successive crystallizations on curcumin levels

Crystallization	Crystals	Curcumin	Contaminants (%)	
	(mg)	(%)	DMC	BDMC
1st	294 ± 0,10	56.9	30.1 ± 0,11	13.0 ± 0,09
2nd	214 ± 0,08	72.8	19.5 ± 0,10	7.7 ± 0,07
3rd	193 ± 0,03	92.2	7.8 ± 0,06	--

Average of the three experiments.

3.2.2. CC separation of pigments from the mother liquor

The composition of the fractions collected during CC of the mother liquor is indicated in Table I.3. Pure pigments, determined by HPLC, were obtained in different fractions, e.g., curcumin in fractions 1 – 14, DMC in 18 – 30 and BDMC in 34 – 47. There was an average of 8.8% loss of pigments on the column and an 8.0 % loss because of the lack of separation of mixtures of pigments. However, the fractions that contained a mixture of the pigments were concentrated and passed through the column again.

3.3. PURITY OF CURCUMINOID PIGMENTS

The purity of the curcuminoid pigments was demonstrated by HPLC analysis and melting point determination. HPLC analysis of the isolated pigments showed single peaks, as indicated in Fig. I.2 with the retention times as described in Table I.4. In this chromatography conditions these values indicated the retention differ times, started with BDMC the molecule less polar. The melting points are also indicated in Table I.4.

Table I.3. Types of curcuminoid pigments in different fractions collected during silica gel CC of the mother liquor using dichloromethane as the eluent

Fractions ¹	Total volume (mL)	Pigments present ²	Weight (mg)
1 - 14	1120	C	31.2
15 - 17	240	C, DMC	4.14
18 -30	960	DMC	30.97
31 - 33	240	DMC, BDMC	3.88
34 - 47	1120	BDMC	21.06

¹ Each fractions contains 80 mL.

² C = curcumin; DMC = demethoxycurcumin; BDMC = bisdemethoxycurcumin.

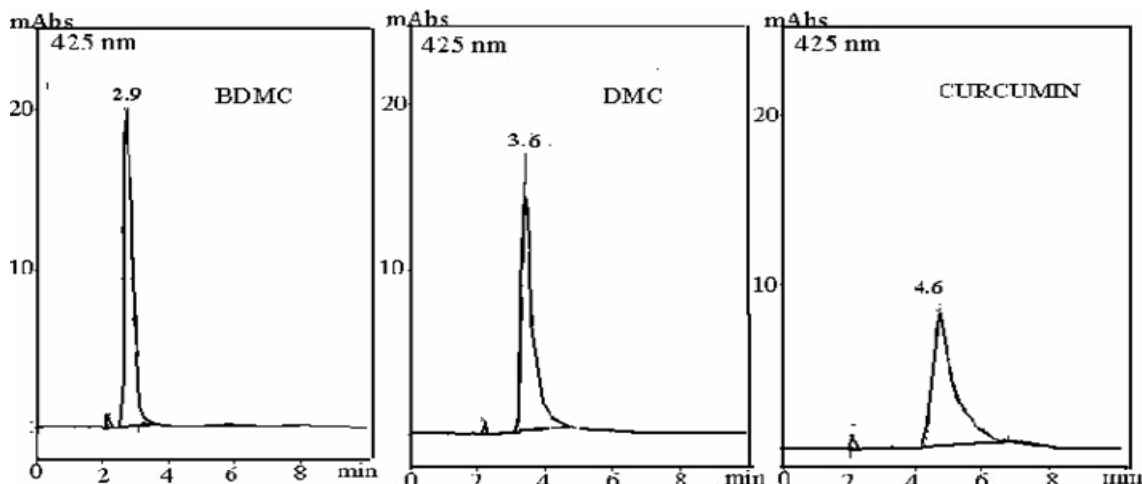


Fig. I.2. HPLC analysis of the isolated curcuminoid pigments. HPLC conditions: spherical Shim-pack CLC-NH₂ column (5 μ m, 4.6 x 150 mm, Shimadzu, Kyoto, Japan), mobile phase of ethanol:water (85:15, v/v), flow rate of 1 mL/min at 22 \pm 1 $^{\circ}$ C, diode array detector at 425 nm. BDMC = bisdemethoxycurcumin, DMC = demethoxycurcumin.

3.4. PHYSICO-CHEMICAL CHARACTERISTICS OF THE ISOLATED CURCUMINOID PIGMENTS

3.4.1. UV-visible spectra

UV-visible spectra indicated that the wavelengths of maximum absorption in ethanol were 429, 424 and 419 nm for C, DMC and BDMC, respectively (Fig. I.3). Molar absorptivity at 425 nm in ethanol was observed to vary from $4.95 \times 10^4 \text{ Lcm}^{-1}.\text{mol}^{-1}$ for BDMC to $6.73 \times 10^4 \text{ Lcm}^{-1}.\text{mol}^{-1}$ for C, which correspond to specific absorptivities ($A_1^{1\%}$) of 1488, 1468 and 1445 gL^{-1} for the C, DMC and BDMC, respectively.

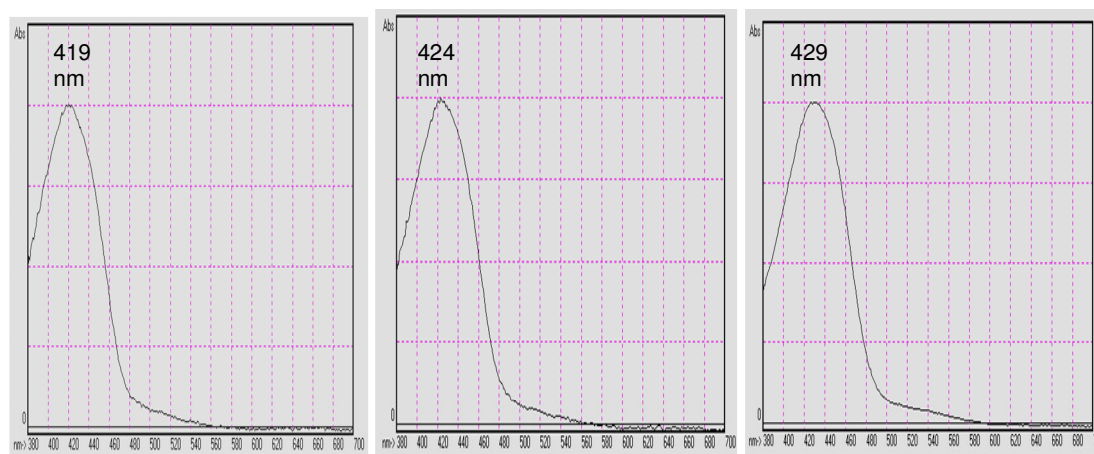


Fig. I.3. Wavelength of maximum absorption of curcuminoid pigments in ethanol. BDMC = bisdemethoxycurcumin, DMC = demethoxycurcumin, C = curcumin.

Other physico-chemical characteristics of the isolated curcuminoid pigments are also shown in table I.4.

Table I.4. Physico-chemical characteristics of the isolated curcuminoid pigments

Parameter	Characteristics ¹		
	C	DMC	BDMC
Melting point (°C)	184	172	222
HPLC, 425 nm (retention time, min)	4.6	3.6	2.9
UV-vis λ máxima in ethanol (nm)	429	424	419
Molar absorptivity in ethanol, 425 nm ($\times 10^4$ L.cm ⁻¹ .mol ⁻¹)	6.73	5.78	4.95
Infrared ² characteristics bands (cm ⁻¹)	2980-2850	2950-2850	Absent

¹ C = curcumin; DMC = demethoxycurcumin; BDMC = bisdemethoxycurcumin.

² aliphatic C-H stretching due to OCH₃.

3.4.2. Infrared spectra

The infrared spectra is in conformity with the structures of C, DMC and BDMC. The absence of absorptions bands in the aliphatic C-H stretching regions (3000 – 2800 cm⁻¹) corresponding to the methoxyl group can be used to distinguish BDMC from C and DMC.

3.4.3. ¹H and ¹³C NMR

A singlet corresponding to the two methoxyl groups in curcumin was observed at δ 3.92 in the ¹H NMR spectrum. For DMC, the corresponding signal was observed at δ 3.82 (Table I.5 and Fig. I.1). The ¹³C NMR signals for the methoxyl groups of curcumin and demethoxycurcumin occurred at δ 55.7 for (Table I.6). The data also generated from the curcuminoid pigments has been reported by MASUDA et al. (1999) and BONG (2000) in previous studies.

Table I.5. ¹H NMR spectral data of the isolated curcuminoid pigments

¹ H	C	DMC	BDMC
1	5.98 (s, 1H)	6.02 (s, 1H))	5.99 (s, 1H))
2-OH	16.41 (d, 1H))		--
3,3'	6.71 (d, <i>J</i> =16 Hz, 2H)	6.67 (d, <i>J</i> =15.8 Hz, 2H)	6.67(d, <i>J</i> =15.8 Hz, 2H)
4,4'	7.60 (d, <i>J</i> =16 Hz, 2H)	7.53 (d, <i>J</i> =15.8 Hz, 2H)	7.61(d, <i>J</i> =15.8 Hz, 2H)
5,5'	--	--	--
6,6'	7.33 (d, <i>J</i> =1.8 Hz, 2H)	7.31(d, <i>J</i> =1.6 Hz, 2H)	7.57(d, <i>J</i> =8.5 Hz, 2H)
7,7'	--	--	6.91(d, <i>J</i> =8.5 Hz, 2H)
8,8'-OH	8.2 (s, 2H)	--	10.3
9,9'	6.89 (d, <i>J</i> =8 Hz, 2H)	6.81 (d, <i>J</i> =8.3 Hz, 2H)	6.91(d, <i>J</i> =8.5 Hz, 2H)
10,10'	7.19(dd, <i>J</i> _{9,10} =8 Hz, <i>J</i> _{6,10} =1.8 Hz, 2H)	7.13(dd, <i>J</i> _{9,10} =8.3 Hz, <i>J</i> _{6,10} =1.6 Hz, 2H)	7.57(d, <i>J</i> =8.5 Hz, 2H)
OMe	3.92 (s, 6H)	3.82 (s, 3H)	--

C = curcumin; DMC = demethoxycurcumin; BDMC = bisdemethoxycurcumin.
s = singlets; d = doublets; Conditions of the NMR ¹H: 200 MHz, DMSO-d₆.

Table I.6. ¹³C NMR spectral data of the isolated curcuminoid pigments

¹³ C	C	DMC	BDMC
1	100.9	100.9	100.9
2-2'	183.2	183.2 / 183.1	183.2
3, 3'	121.1	121.1 / 120.8	121.1
4, 4'	140.7	140.7 / 140.4	140.1
5, 5'	126.4	126.4 / 125.8	126.8
6, 6'	111.4	111.2 / 130.4	130.0
7,7'	148.0	148.0 / 115.7	115.9
8, 8'	149.4	149.8 / 159.8	159.7
9, 9'	115.7	115.9 / 115.7	115.9
10, 10'	123.1	123.2 / 123.1	130.0
O-Me	55.7	55.7	--

C = curcumin; DMC = demethoxycurcumin; BDMC = bisdemethoxycurcumin.
Conditions of the NMR ¹³C ¹H: 50 MHz, DMSO-d₆.

3.4.4. CIE L*a*b* color characteristics

The color characteristics of the isolated curcuminoid pigments are shown in table I.7. There was a significant difference in L values, indicating that BDMC was brighter than the other pigments. The positive a* values observed for C and DMC indicated the red direction while the negative a* values observed for BDMC showed the green direction for the pigments. Chroma or chromaticity of the pigments indicated higher vividness for C, while BDMC was dull. No significant difference was observed in hue angle for the three curcuminoid pigments.

Table I.7. Color characteristics of the isolated curcuminoid pigments

CIE Parameter	Characteristics		
	C	DMC	BDMC
L*	72.84 b	72.15 b	81.54 a
a*	16.84 a	1.96 b	-4.72 c
b*	110.06 a	82.73 b	49.44 c
Chroma	111.34 a	82.75 b	49.64 c
Hue	81.30	88.64	84.55

C = curcumin; DMC = demethoxycurcumin; BDMC = bisdemethoxycurcumin.

Means with the same letter in the same line do not differ significantly (Duncan test, 5% probability).

4. CONCLUSIONS

TLC separation of curcuminoid pigments was possible on silica gel 60G plates using dichloromethane:methanol 99:1. The separation of curcuminoid pigments was performed by crystallization of curcumin in methanol: water and further separation by CC using silica gel 60G impregnated with sodium hydrogen phosphate and dichloromethane as the eluent. The purity of each curcuminoid pigment was confirmed by HPLC and melting point. The isolated pigments were characterized physico-chemically and with respect to CIE color characteristics. This data can be used for identification and quantification of individual curcuminoid pigments. The isolation and identification of curcuminoids allows carrying through studies on the biological activities of each isolated pigment.

Capítulo II

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA *IN VITRO* DA CÚRCUMA E DERIVADOS

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA *IN VITRO* DA CÚRCUMA E DERIVADOS

1. INTRODUÇÃO

A deterioração tem sido uma das grandes preocupações e uma das maiores causas de perdas de alimentos e de prejuízos à saúde e à produtividade do homem. O uso de aditivos tem sido efetivo na prevenção da deterioração dos alimentos, entretanto, a demanda por produtos naturais tem aumentado devido à conscientização sobre os efeitos tóxicos de alguns aditivos e à tendência atual de se voltar ao natural. Podemos citar a tartrazina, um corante amarelo, utilizado para colorir alimentos bebidas e fármacos, que não inibe a atividade da ciclooxygenase. Além disto, novos patógenos veiculados por alimentos têm sido identificados e tem-se observado o desenvolvimento de resistência de vários destes aos antibióticos tradicionalmente usados. Desta forma, pesquisas são necessárias para identificar substâncias naturais capazes de substituir os aditivos na inibição de bactérias e de fungos (NEGI et al., 1999; SINGH et al., 2002a; GUL et al., 2004).

Algumas plantas podem ser utilizadas como alternativa para o controle de agentes deteriorantes de alimentos por conterem substâncias com atividade antimicrobiana e por terem sido consumidas por várias décadas sem causar efeitos adversos ao homem (KIM et al., 2003; LEE et al., 2003). O rizoma da cúrcuma, *Curcuma longa* L., tem sido muito utilizado na indústria alimentícia, como corante, aromatizante e como ingrediente no preparo de temperos, laticínios e pratos prontos (GOVINDARAJAN, 1980; APISARIYAKUL et al., 1995; SILVA et al., 2005). Nas últimas décadas, vários trabalhos têm relatado atividades dos extratos da cúrcuma, dentre elas, carminativa, antiespasmódica, antimicrobiana, antiprotozoária, antiviral, antioxidante, e anticancerígena (LEE et al., 2003; GUL et al., 2004).

De acordo com BHAVANI SHANKAR & SREENIVASA MURTHY (1979) e GUL et al. (2004), a cúrcuma inibiu de forma significativa o crescimento de algumas bactérias intestinais e patogênicas *in vitro*, como *Staphylococcus aureus*, mas não inibiu a *Escherichia coli*. Baixa atividade antibacteriana foi citada por TONNESSEN & KARLSEN (1987) e SINGH et al. (2002a) para algumas bactérias e por APISARIYAKUL et al. (1995) para fungos patogênicos. Entretanto, de acordo com KIM et al. (2003), extratos de

cúrcuma apresentaram atividade antifúngica *in vitro* para algumas cepas de *Trichophyton* e *in vivo* para cepas de *Botrytis*, *Erysiphe*, *Phytophthora*, *Puccinia*, *Pyricularia* e *Rhizoctonia*.

Observa-se uma diversidade de informações na literatura sobre as atividades antimicrobianas da cúrcuma. Além do mais, as propriedades antimicrobianas foram estudadas, na maioria das vezes, com extratos da cúrcuma em pó, ou com a curcumina disponível comercialmente, a qual contém uma mistura dos pigmentos curcuminóides - curcumina, desmetoxicurcumina e bisdesmetoxicurcumina. A cúrcuma em pó, obtida do rizoma seco, contém óleos além dos pigmentos curcuminóides. De acordo com LUTOMSKI et al. (1974), APISARIYAKUL et al. (1995) e SINGH et al. (2002a,b), o óleo da cúrcuma apresenta atividades bacteriostática e fungicida. Na literatura consultada não ficou claro qual se apenas um componente da cúrcuma seria o responsável pela atividade antimicrobiana ou esta atividade seria fruto de um sinérgismo entre os diferentes compostos.

Este trabalho teve como objetivo avaliar o potencial antimicrobiano de extratos etanólicos da cúrcuma em pó, da curcumina disponível comercialmente, dos três pigmentos curcuminóides purificados e do óleo da cúrcuma, sobre algumas bactérias e fungos de relevância na indústria alimentícia.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. MATERIAL

Rizomas de cúrcuma (*Curcuma longa* L., Zingiberaceae), imediatamente após a colheita, foram lavados, selecionados, branqueados por 10 min, desidratados a 60 °C, triturados e peneirados em tamis de 40 mesh (BAMBIRRA et al., 2002). Para a obtenção do extrato etanólico da cúrcuma em pó, o pó (50 g) foi submetido a refluxo em 500 mL de etanol, sob proteção da luz, por 90 minutos. A amostra foi filtrada a vácuo, o solvente evaporado em evaporador rotatório a 60 °C (Büchi, Suíça) e o pó obtido utilizado para preparar uma solução de 5 mg/mL em etanol.

A curcumina - 50 mg - (Merck, Darmstadt, Alemanha) foi dissolvida em 100 mL de etanol em banho ultrasônico por 15 minutos. Os pigmentos curcuminóides purificados - curcumina, desmetoxicurcumina (DMC) e bisdesmetoxicurcumina (BDMC) - foram obtidos por recristalização e separação por cromatografia em coluna de sílica gel (PÉRET-ALMEIDA et al., 2005). Soluções etanólicas de cada pigmento foram preparadas na concentração de 5 mg/mL cada. O óleo essencial da cúrcuma foi obtido por

hidrodestilação em aparelho de Clevenger, coletado do condensador após 6 h de funcionamento do sistema contendo 60 g de cúrcuma em pó e 500 mL de água em balão de 1000 mL (SILVA et al., 2005).

Para a determinação da atividade antimicrobiana foram utilizadas culturas ATCC (tabela 1). Estas foram ativadas por 24 h e mantidas a 5 °C. Deste material foram obtidas amostras para manutenção da cultura mãe, e para os repiques de 24 horas que antecederam aos ensaios, em Agar Antibiotic no. 1, a 36 ± 1 °C para as bactérias, e em Agar Saboraud-Dextrose (Dialab Diagnósticos, Montes Claros, MG), a 25 ± 1 °C, para fungos e leveduras.

O inóculo foi padronizado transferindo-se colônias dos microrganismos para solução salina peptonada estéril (0,9%, p/v) em espectrofotômetro em 50 ± 1 % de transmitância a 580 nm (solução salina – branco). Para o preparo do inóculo de *Aspergillus niger*, adicionou-se 0,01 % v/v de Tween 80 para melhor dispersão das células. O branco foi adicionado de Tween 80 na mesma proporção. Para compor o meio de superfície, foi retirada alíquota de 0,05% v/v do inóculo, incorporada ao meio de cultura e este depositado sobre a placa. Os ensaios de atividade antimicrobiana foram realizados no Laboratório de Controle de Qualidade da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais.

TABELA II.1. Microrganismos utilizados nos ensaios de atividade antimicrobiana

Microrganismo	Espécie	ATCC¹
Bactérias	<i>Staphylococcus aureus</i>	6538P
	<i>Bacillus subtilis</i>	6633
	<i>Salmonella choleraesuis</i>	14028
	<i>Escherichia coli</i>	8739
Fungos	<i>Aspergillus niger</i>	16404
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2601
	<i>Candida albicans</i>	10231

¹ ATCC = American Type Culture Collection.

Os antibióticos usados como controles foram soluções (1 mg/mL) de cloranfenicol (Sigma, St. Louis, MO, EUA) para as bactérias; de anfotericina B (50% pureza, Fungizon® Squibb, São Paulo, SP, Brasil) para *C. albicans* e *S. cerevisiae*; e de sulfato de gentamicina (Sigma, St. Louis, MO, EUA) para o *A. niger*.

2.2. MÉTODOS

2.2.1. Determinação da atividade antimicrobiana *in vitro*

A atividade antimicrobiana *in vitro* foi determinada pelo método de difusão em agar (NUNAN et al., 1985). Os discos de papel estéreis de 6 mm de diâmetro (Cecon, São Paulo, Brasil) foram impregnados com os extratos e levados à estufa a 36 °C para a evaporação do solvente.

Para os ensaios, placas de Petri de 90 mm de diâmetro foram adicionadas de 20 mL de meio base e, após solidificação, 5 mL de meio de superfície contendo os inóculos dos microrganismos. Os discos impregnados foram depositados sobre os meios de cultura, e as placas incubadas a 36 ± 1 °C/24 h e a 25 ± 1 °C/48 h para bactérias e fungos, respectivamente. Os diâmetros dos halos de inibição foram medidos com paquímetro. Discos impregnados com os solventes e com os antibióticos (5 e 10 µg/disco) foram utilizados como controles.

2.2.2. Determinação dos pigmentos curcuminóides

Os teores de pigmentos curcuminóides foram determinados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em equipamento da Shimadzu (Kyoto, Japão), injetor Rheodyne de 20 µL, detector arranjo de diodos a 425 nm, coluna Shim-pack CLC-NH₂ (4,6 x 150 mm, Shimadzu, Kyoto, Japão), e fase móvel etanol:água (85:15, v/v) em fluxo de 1 mL/min. A identificação foi feita por comparação do tempo de retenção dos picos e confirmada pelo espectro de absorção no UV-visível. A quantificação foi feita utilizando-se as respectivas absorvidades (PERET-ALMEIDA et al., 2005). Os extratos etanólicos da cúrcuma e dos pigmentos curcuminóides foram filtrados em membrana HV de 0,45 µm (Millipore, Billerica, MA, EUA). Para os óleos essenciais, foim pesada uma aliquota de 100 mg foram extraídos com 50 mL de etanol por 30 minutos sob agitação, filtrados e injetados no cromatógrafo.

2.2.3. Caracterização do óleo essencial da cúrcuma

O rendimento do óleo essencial da cúrcuma foi quantificado em função do volume obtido por massa de cúrcuma em pó usada. O óleo foi também caracterizado quanto ao índice de refração a 30 °C (refratômetro de Abbé), densidade (picnometro) e perfil das substâncias voláteis por cromatografia gasosa.

As substâncias voláteis foram obtidas por microextração em fase sólida em fibra de 100 µm de polidimetilsiloxano (57300-U, Supelco, PA, EUA) em contato com o headspace de 15 mg da amostra aquecido a 80 °C/5 min (MATA et al., 2004). O cromatógrafo utilizado foi o GC-17A (Shimadzu, (Kyoto, Japão), com detector de ionização de chama, coluna capilar DB-1 (25 m x 0,23 mm, 0,52 µm) e hélio como gás de arraste. A temperatura do injetor foi 220 °C e a do detector 250 °C. O tempo de dessorção da amostra foi 10 minutos e a temperatura durante a corrida variou de 60 a 200 °C. Foram utilizados como padrão, borneol, limoneno e ar-turmerona permitindo assim a identificação dos picos e ainda, por comparação do tempo de retenção com padrões, dados coletados na literatura.

2.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os experimentos foram realizados com seis repetições. Os resultados foram submetidos à análise de variância, sendo a comparação das médias feita pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. TEORES DE PIGMENTOS CURCUMINÓIDES NOS EXTRATOS ALCOÓLICOS DA CÚRCUMA E NO ÓLEO ESSENCIAL

Foram encontrados na cúrcuma em pó 4,1 g/100 g de pigmentos curcuminóides (Tabela II. 2). Os três pigmentos estavam presentes, sendo a curcumina predominante (59%), seguida da desmetoxicurcumina (29%) e da bisdesmetoxicurcumina (12%). Resultados semelhantes foram encontrados para diferentes variedades de cúrcuma (VIASAN et al., 1989; JAYAPRAKASHA et al., 2002). A curcumina disponível comercialmente continha a mistura dos três pigmentos na mesma ordem de predominância, porém, os percentuais foram diferentes: 71%, 25% e 4%,

respectivamente. Os três pigmentos curcuminóides isolados tiveram pureza confirmada por CLAE (Tabela II. 2 e Figura II. 1).

TABELA II. 2. Teores de pigmentos curcuminóides nos diferentes produtos da cúrcuma.

Amostra	Teores de pigmentos (g/g)		
	Curcumina	DMC	BDMC
Cúrcuma em pó	0,024 ± 0,001	0,012 ± 0,001	0,005 ± 0,001
Curcumina comercial	0,713 ± 0,06	0,246 ± 0,05	0,041 ± 0,02
Pigmentos isolados			
Curcumina	1,0 ± 0,02	nd	nd
Desmetoxicurcumina	nd	1,0 ± 0,02	nd
Bisdesmetoxicurcumina	nd	nd	1,0 ± 0,01
Óleo essencial	0,002 ± 0,000	0,0006 ± 0,0001	nd

DMC = Desmetoxicurcumina; BDMC = Bisdesmetoxicurcumina.

nd – não detectado (limite de detecção em g/g = $2,7 \times 10^{-5}$ para curcumina, $1,2 \times 10^{-5}$ para DMC e $0,57 \times 10^{-5}$ para BDMC).

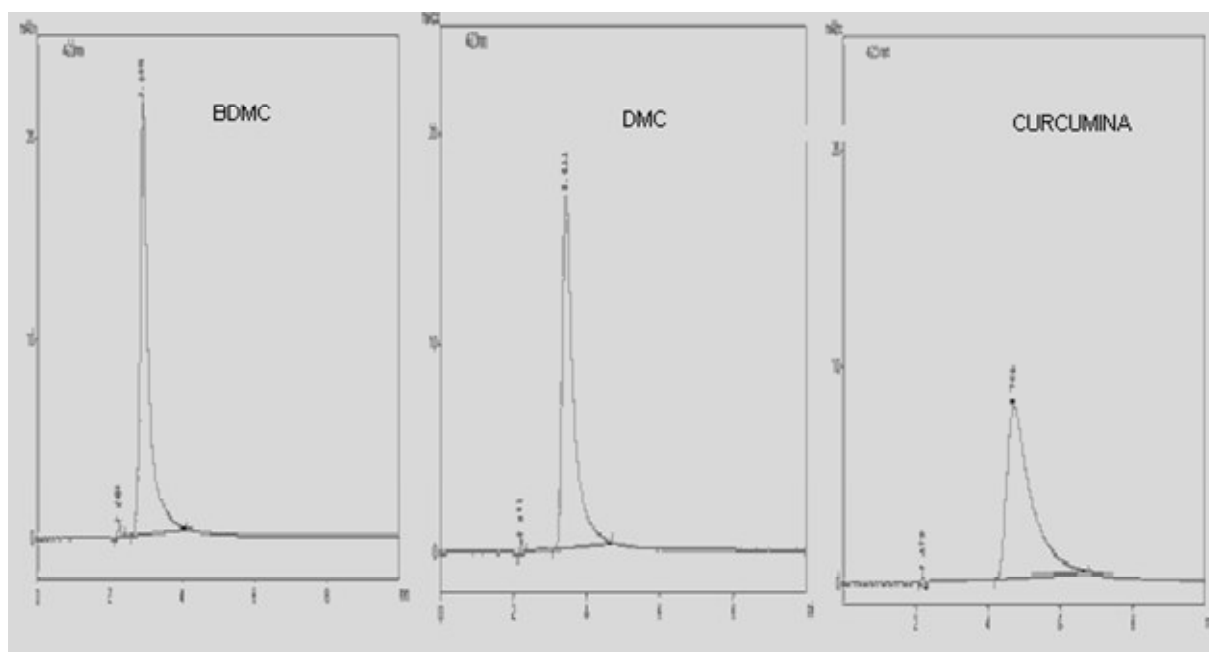


FIGURA II. 1 - Perfil cromatográfico dos pigmentos isolados da cúrcuma: bisdesmetoxicurcumina (BDMC), desmetoxicurcumina (DMC) e curcumina. Condições cromatográficas: coluna esférica Shim-pack CLC-NH₂ (4,6 x 150 mm); fase móvel etanol:água (85:15 v/v); fluxo de 1 mL/min, detector arranjo de diodos a 425 nm.

3.3. ATIVIDADE ANTIMICROBIANA *IN VITRO* DOS EXTRATOS ETANÓLICOS DA CÚRCUMA E DOS PIGMENTOS CURCUMINÓIDES

Não foi observada atividade antimicrobiana para extratos etanólicos da cúrcuma em pó, da curcumina comercial e dos pigmentos curcuminóides purificados, frente as bactérias e os fungos pesquisados, com exceção da bisdesmetoxicurcumina para o *Bacillus subtilis*. Estes resultados indicam que a curcumina e a desmetoxicurcumina em concentrações de até 100 µg/disco não apresentaram atividade antimicrobiana para os microrganismos testados.

A bisdesmetoxicurcumina apresentou atividade apenas na concentração de 100 µg/disco para o *B. subtilis*. E ainda, não foi observado o sinergismo para a mistura em comparação aos pigmentos isolados para a atividade antimicrobiana nas concentrações testadas.

Os resultados obtidos para os extratos brutos avaliados, contendo uma mistura dos pigmentos curcuminóides confirmam os achados de TONNESSEN & KARLSEN (1987) e SINGH et al. (2002a) para *E. coli*, *Salmonella*, *S. aureus* e por APISARIYAKUL et al. (1995) para fungos patogênicos e leveduras. De acordo com TONNESSEN & KARLSEN (1987) e DAHL et al. (1989), a atividade antimicrobiana seria observada apenas em concentrações elevadas ou em menores concentrações quando exposta à radiação no visível, proveniente de produtos da fotodecomposição.

Os resultados obtidos com os pigmentos purificados foram descritos pela primeira vez no presente trabalho. Os halos obtidos com 100 µg/disco da bisdesmetoxicurcumina foram significativamente maiores (46%) quando comparados aos halos de 10 µg/disco do antibiótico cloranfenicol. Estes resultados indicam que a bisdesmetoxicurcumina apresentou atividade antimicrobiana significativa para o *B. subtilis*, sendo o halo de inibição ($9,17 \pm 0,50$ mm) significativamente maior (teste Duncan, $p < 0,05$) que o do antibiótico cloranfenicol ($8,30 \pm 0,28$ mm). Este resultado indicou que a inibição do desenvolvimento microbiano ocorreu com a utilização da bisdesmetoxicurcumina, porém, foi necessária uma dose dez vezes superior a utilizada do cloranfenicol.

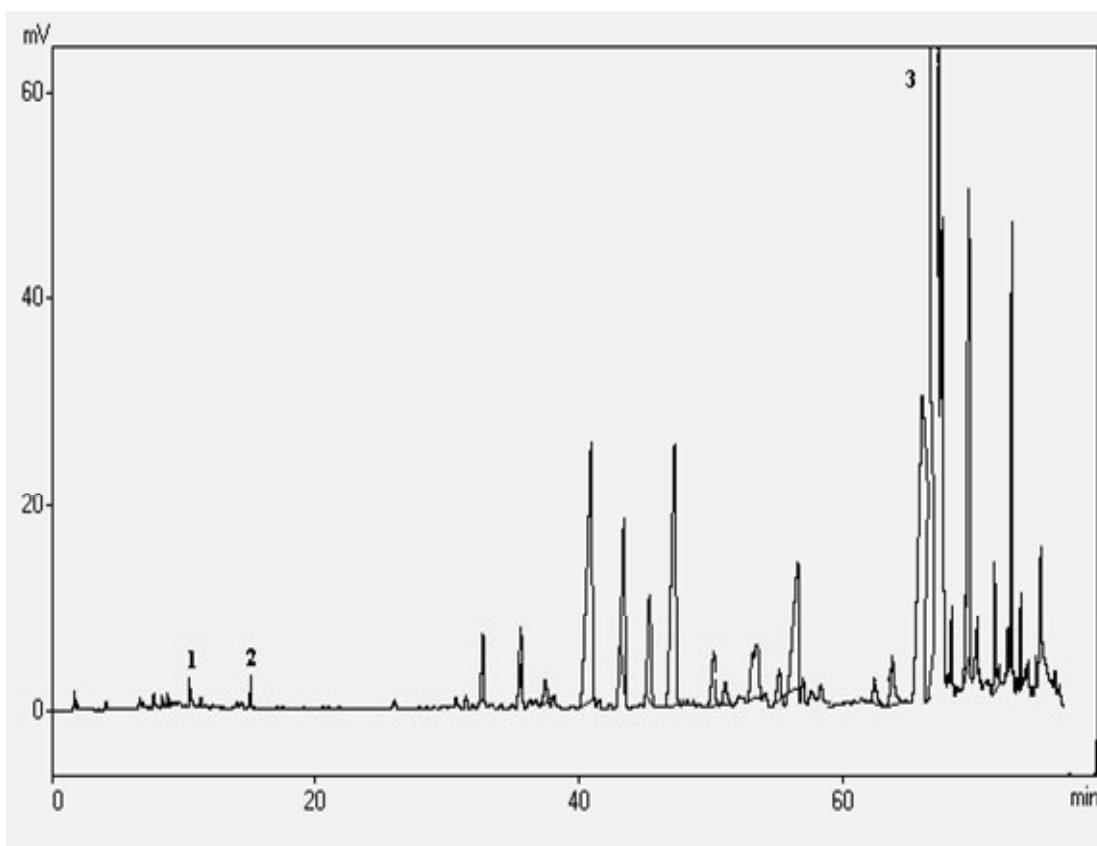


FIGURA II. 2 - Perfil cromatográfico das substâncias voláteis dos óleos essenciais da cúrcuma obtidos por hidrodestilação em aparato de Clevenger. Picos identificados: pico (1) limoneno; (2) borneol e (3) ar-turmerona. Condições cromatográficas: GC-FID, coluna capilar DB-1 (25 m x 0,32 mm; 0,52 μ m), gás de arraste hélio; temperaturas do injetor 220 °C; do detector 250 °C, e da coluna: programação de 60 a 220 °C.

3.4. ATIVIDADE ANTIMICROBIANA *IN VITRO* DO ÓLEO DA CÚRCUMA

A atividade antimicrobiana do óleo essencial da cúrcuma (Tabela 3) foi maior para o *B. subtilis* seguido do *S. choleraesuis* nas duas concentrações pesquisadas. A maior atividade antimicrobiana observada para a bactéria gram positiva, também observada por SINGH et al. (2002a), pode estar associada ao fato destas não possuírem uma membrana externa capaz de restringir a penetração de substâncias (GUL et al., 2004).

Um aumento na concentração dos antibióticos não causou um aumento significativo nos diâmetros dos halos de inibição, indicando que estes estão sendo utilizados na capacidade máxima de inibição ou por saturação da difusão do antibiótico no meio. Por outro lado, ao aumentar a concentração do óleo de 45 para 90 μ g, houve um aumento

significativo nos diâmetros dos halos de inibição que variaram de 60% para a *E. coli* a 131% para o *B. subtilis*.

Para todos os microrganismos (exceto a *E. coli*) com 90 µg do óleo obteve-se um halo maior que os obtidos com os respectivos antibióticos na concentração de 10 µg. O aumento no halo de inibição variou de 6% para o *S. choleraesuis* e *A. niger* a 44% para o *B. subtilis*.

Não foram observados halos de inibição do óleo essencial para *S. aureus* e para *C. albicans*. Resultados similares foram obtidos por APISARIYAKUL et al. (1995), que observaram a insensibilidade de diferentes espécies de *Candida* ao óleo da cúrcuma. Apesar dos dados ainda serem contraditórios, possivelmente devido a diferenças metodológicas, os resultados revelam que o óleo essencial da cúrcuma constitui um agente antimicrobiano em potencial. Vários componentes poderiam ser responsáveis pela atividade antimicrobiana como fenóis, terpenos, aldeídos e cetonas, sendo que várias destas já foram identificadas em óleo da cúrcuma (OHSHIRO et al., 1990; MATA et al., 2004). De acordo com NEGI et al. (1999) e LEE et al. (2003), a fração do óleo da cúrcuma com maior percentual de ar-turmerona, foi a que apresentou maior atividade antimicrobiana. Entretanto, estudos são necessários para identificar quais seriam os compostos responsáveis pela atividade antimicrobiana no óleo da cúrcuma produzido no Brasil e estudar as possíveis interações. Estes dados serão relevantes nos teores dos constituintes, que pode ter implicações na atividade.

TABELA II. 3. Atividade antimicrobiana *in vitro* (método de difusão em ágar) do óleo essencial da cúrcuma obtido por hidrodestilação em aparelho de Clevenger

Microrganismo	Óleo essencial da cúrcuma		Antibiótico	
	Diâmetro dos halos de inibição			
	45 µg/disco	90 µg/disco	5 µg/disco	10 µg/disco
<i>B. subtilis</i>	8,02 ± 0,19 ^{a,z}	18,51 ± 0,49 ^{a,x}	12,71 ± 0,34 ^{a,y}	12,87 ± 0,45 ^{a,y}
<i>S. choleraesuis</i>	7,33 ± 0,20 ^{b,z}	13,66 ± 0,30 ^{b,x}	12,81 ± 0,36 ^{a,y}	12,90 ± 0,32 ^{a,y}
<i>E. coli</i>	6,30 ± 0,17 ^{c,y}	10,09 ± 0,46 ^{d,x}	10,03 ± 0,19 ^{c,x}	10,20 ± 0,15 ^{c,x}
<i>A. niger</i>	6,76 ± 0,38 ^{bc,z}	12,02 ± 0,47 ^{c,x}	11,21 ± 0,42 ^{b,y}	11,38 ± 0,37 ^{b,y}
<i>S. cerevisiae</i>	6,18 ± 0,06 ^{c,z}	11,55 ± 0,41 ^{c,x}	10,08 ± 0,23 ^{c,y}	10,10 ± 0,41 ^{c,y}

¹ Valores médios (± desvios padrão) com letras diferentes (x-z) na mesma linha e (a-e) na mesma coluna são diferentes (teste Duncan, p < 0,05).

4. CONCLUSÕES

Não foi observada atividade dos extratos etanólicos da cúrcuma, da curcumina e da desmetoxicurcumina contra o crescimento de *S. aureus*, *B. subtilis*, *S. choleraesuis*, *E. coli*, *A. niger*, *S. cerevisiae*, e *C. albicans*. Apenas o extrato etanólico da bisdesmetoxicurcumina apresentou atividade antimicrobiana *in vitro* em relação ao *Bacillus subtilis*.

O óleo essencial da cúrcuma obtido por hidrodestilação em aparelho de Clevenger apresentou atividade antimicrobiana *in vitro* para o *B. subtilis*, *S. choleraesuis*, *E. coli*, *A. niger* e *S. cerevisiae*, sendo esta maior com o aumento da concentração. A atividade antimicrobiana foi maior do que aquela obtida com os respectivos antibióticos.

Os resultados obtidos sugerem ser a bisdesmetoxicurcumina e o óleo essencial da cúrcuma um agente antimicrobiano em potencial para uso na indústria alimentícia e farmacêutica.

Capítulo III

ESTABELECIMENTO DE GEMAS, INDUÇÃO E FORMAÇÃO DE PIGMENTOS CURCUMINÓIDES E ÓLEOS ESSENCIAIS EM CALOS E RAÍZES DA *Curcuma longa* L. *IN VITRO*

ESTABELECIMENTO DE GEMAS, INDUÇÃO E FORMAÇÃO DE PIGMENTOS CURCUMINÓIDES E ÓLEOS ESSENCIAIS EM CALOS E RAÍZES DE *Curcuma longa* L. *IN VITRO*

1. INTRODUÇÃO

Curcuma longa L., pertencente à família Zingiberaceae, é uma planta herbácea, provida de um rizoma rico em pigmentos, óleos essenciais e amido. Conhecida internacionalmente também como *turmeric*, *saffron*, a cúrcuma ou açafrão da terra, como mais frequentemente denominada no Brasil, é bastante utilizada pela medicina asiática tradicional como carminativo, digestivo, antiespasmódico, antidiarréico, diurético, excitante, no tratamento de tosse e resfriados, e ainda como cicatrizante (GOVINDARAJAN, 1980; DUKE, 1997). Vários estudos têm confirmado as atividades antioxidantes, antiinflamatórias, antimicrobianas e anticancerígenas da cúrcuma (AMMON & WAHL, 1990; DUKE, 1997; SHOBA et al., 1998; ASAI et al., 1999).

A cúrcuma tem sido muito utilizada como corante na indústria alimentícia e farmacêutica, por apresentar características de cor semelhantes às da tartrazina, corante amarelo sintético muito utilizado, mas que pode causar efeitos nocivos à saúde humana (MARTINS & RUSIG, 1992; GOLDWYN, 1997). As propriedades farmacológicas da cúrcuma têm sido atribuídas, aos pigmentos curcuminóides e ao óleo essencial (MESA et al., 2000).

A cúrcuma é comumente propagada vegetativamente através do plantio de uma parte do rizoma. Entretanto, seu desenvolvimento pode ser afetado por várias doenças causadas por microrganismos presentes no solo. O amolecimento dos rizomas causado pelos fungos *Pythium myriotylum* e *Pythium graminicolum* e pela bactéria *Pseudomonas solanacearum* são os maiores problemas na produção de cúrcuma (MELLO et al., 2000; SALVI et al., 2002). A multiplicação através do cultivo de célula, denominado micropropagação, permite a produção de rizomas isentos de doenças e ainda uma redução no tempo de propagação. Um fragmento da planta é colocado em condições assépticas em um meio de cultivo estéril contendo ágar adicionado de sais minerais, vitaminas, fonte de carbono e reguladores de crescimento. O cultivo é realizado em local com temperatura e luminosidades controladas por tempo determinado (THORPE, 1980; PIETSCH, 1998).

Meios de cultura como o de Murashige & Skoog - MS, (MURASHIGE & SKOOG, 1962) e o B5 (GAMBORG et al., 1968) têm sido usados pelos efeitos positivos no crescimento e desenvolvimento de plantas. Para acelerar as respostas fisiológicas nas plantas e possibilitar a diferenciação celular pode-se suplementar com os reguladores de crescimento principalmente do grupo das auxinas e cianinasao meio em diferentes concentrações e combinações (PIETSCH, 1998).

Outros componentes do meio de cultivo podem ser modificados como os sais minerais. Nos meios de cultura são utilizadas quantidades de minerais, superiores às necessidades efetivas dos tecidos. Entretanto, altos teores destes sais podem causar alteração do equilíbrio do potencial osmótico (HESS, 1975; MALAVOLTA et al., 1997). As exigências minerais durante o cultivo variam com a espécie, a natureza do tecido e o estado fisiológico, mas também variam com o método de cultivo e o tipo de organogênese da planta. Os meristemas e, de forma geral, os tecidos com atividade metabólica elevada, podem apresentar elevadas necessidades em potássio, pois este mineral atua na síntese de aproximadamente 50 enzimas, dentre elas as sintetases, redutases, oxidases, transferases e aldolases (MALAVOLTA et al., 1997; ALONSO, 1998). De acordo com HUBER & ARNY (1985) e PERRENOUD (1990), plantas com altas concentrações de potássio nos tecidos são mais susceptíveis à síntese e acúmulo de compostos fenólicos. No cultivo da *Curcuma longa* L. tem-se recomendado doses elevadas de potássio na adubação durante o cultivo em solo, visando o aumento dos teores de pigmentos curcuminóides (GOTO, 1993; CECÍLIO FILHO, 1996).

A possibilidade de se propagar a cúrcuma *in vitro* e estimular a produção de metabólitos seria uma alternativa viável para a otimização da produção dos compostos com as propriedades farmacológicas ou funcionais. NADGAUDA et al. (1978) investigaram a propagação vegetativa dos brotos da cúrcuma em meio MS com água de coco, cinetina (CIN) e benzilaminopurina (BAP). Os brotos alongados foram transferidos para o meio White com 2% de sacarose até o desenvolvimento das raízes quando, então, foram transplantadas com sucesso para a casa de vegetação. BALANCHANDRAN et al. (1990) estabeleceram protocolos eficientes para a micropropagação da cúrcuma em meio MS utilizando diferentes concentrações de reguladores de crescimento BAP e CIN. Observaram não haver necessidade de incorporar água de coco ao meio de cultivo e de utilizar um meio de cultura intermediário, antes da transferência ao solo, como sugerido por NADGAUDA et al. (1978).

ANAND et al. (1999) investigaram a influência de alguns tipos de reguladores de crescimento no desenvolvimento da cúrcuma em meio MS. Um aumento na regeneração

dos tecidos foi obtido na presença de ácido indol acético - AIA (0,5 mg/L) e BAP (1,5 mg/L). A organogênese e a formação de plântulas ocorreram quando foi adicionado ácido giberélico (0,5 mg/L) aos meios que continham as auxinas, 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), ácido naftaleno acético (ANA) e AIA nas concentrações de 0,5 mg/L associadas à citocinina BAP na concentração de 1,0 mg/L. Estes resultados indicaram a influência dos reguladores de crescimento no desenvolvimento da planta.

O objetivo geral deste trabalho foi definir um protocolo para o estabelecimento da cultura da *Curcuma longa* L. *in vitro* e otimização da produção de metabólitos secundários, dentre eles, os pigmentos curcuminóides e os óleos essenciais.

Os objetivos específicos foram:

- (i) verificar a influência do meio de cultivo e de alguns tipos e concentrações de reguladores de crescimento no estabelecimento de gemas da *Curcuma longa* L. *in vitro*;
- (ii) verificar a influência de diferentes concentrações de alguns reguladores de crescimento na indução de calos e raízes;
- (iii) verificar a influência de diferentes concentrações de KNO₃ e KCl no desenvolvimento de calos e raízes;
- (iv) avaliar a influência do regulador de crescimento selecionado e de diferentes concentrações de KNO₃ e KCl e nos teores de pigmentos curcuminóides e no perfil de óleos essenciais nos calos e raízes obtidos no cultivo *in vitro*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. MATERIAL

Rizomas de *Curcuma longa* L., desenvolvida de acordo com as recomendações de CECÍLIO FILHO (1996), foram obtidos na Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, em junho de 2001, quando a planta havia completado 12 meses de cultivo. Os rizomas foram submetidos a uma lavagem inicial com água em abundância, e escovação leve. A cultura de células foi estabelecida utilizando como explantes gemas obtidas do brotamento dos rizomas. Os cortes foram feitos com lâmina de aço inox esterilizado (1 cm de comprimento e peso da gema de aproximadamente 0,085 g).

A assepsia superficial das gemas foi feita por imersão em álcool 70 °GL durante 1 minuto, e, em seguida, em solução com hipoclorito de sódio a 4 %, sob agitação, por 30 minutos. Após esta etapa, o material foi retirado e submetido ao enxágüe com água destilada estéril por 5 vezes. Em capela de fluxo laminar os explantes foram inoculados nos frascos de meio de cultivo esterilizados, os quais foram transferidos para sala de cultivo, com luminosidade de 20 $\mu\text{mol/s} \cdot \text{m}^2$ de radiação provenientes de lâmpadas frias fluorescentes tubulares (Philips, SP), temperatura de 25 ± 2 °C e um fotoperíodo de 16 horas (DANTAS-BARROS et al., 1993; SUNITIBALA et al., 2001).

Os componentes dos meios de cultivo Murashige-Skoog (MURASHIGE & SKOOG, 1962) e B5 (GAMBORG et al., 1968) foram adquiridos da Merck (Darmstadt, Alemanha) e da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). Os reguladores de crescimento utilizados para compor o meio de cultivo: ácido naftaleno acético (a auxina) – ANA e cinetina - CIN e benzilaminopurina – BAP (citocininas), e foram adquiridas da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). Os meios MS e B5 foram acrescidos de 30 g/L de sacarose e 8 g/L de agar (DANTAS-BARROS et al., 1993). Posteriormente, os reguladores de crescimento foram adicionados e o pH do meio ajustado para 5,8, foram distribuídos, então, 30 mL para frascos de vidro de 300 mL, os quais foram vedados e esterilizados em autoclave a 121 °C e 1,08 kg/cm² por 20 minutos.

Os brotos foram cultivados no Horto Medicinal da Universidade Federal de Lavras. Os rizomas obtidos foram analisados no Laboratório de bioquímica de Alimentos da Faculdade de Farmácia, UFMG.

Padrões de curcumina, borneol e limoneno foram adquiridos da Merck (Darmstadt, Alemanha). Padrão de ar-turmerona foi gentilmente cedido pela Prof. Marília Martins Melo da Escola de Veterinária, UFMG.

2.2. MÉTODOS

Para atender os objetivos deste trabalho, vários experimentos foram executados. Para o estabelecimento da cultura *in vitro* foram investigados a eficiência de diferentes meios de cultivo e de diferentes reguladores de crescimento. Para o desenvolvimento de calos e raízes, foram pesquisados o tipo de regulador de crescimento e a incorporação ao meio de sais de potássio (KNO₃ e KCl). Os calos e raízes obtidos foram analisados quanto à presença e teores de pigmentos curcuminóides e quanto à presença de óleos essenciais.

2.2.1. Estudo da influência do meio de cultivo e de reguladores de crescimento no estabelecimento de gemas

Para avaliar a influência dos meios de cultivo no estabelecimento de gemas, foram inoculadas 5 gemas em frascos de 300 mL contendo 30 mL de meio MS e B5. Estes meios foram suplementados com reguladores de crescimento ANA (auxina), BAP e CIN (citocininas) nas seguintes combinações e concentrações: BAP:CIN - 1:1 mg/L (NADGAUDA et al., 1978; NADGAUDA et al., 1986; SIT, 1997); ANA:BAP, 1:1 mg/L (SALVI et al., 2002), e BAP, 3 mg/L (BALANCHANDRAN et al., 1990).

Os frascos contendo os meios inoculados foram levados à sala de cultivo onde permaneceram a 25 ± 2 °C (Figura III.1). Após 20 dias, os frascos foram retirados e avaliados quanto à presença de gemas viáveis. Cada ensaio foi realizado com 6 frascos e 3 repetições.

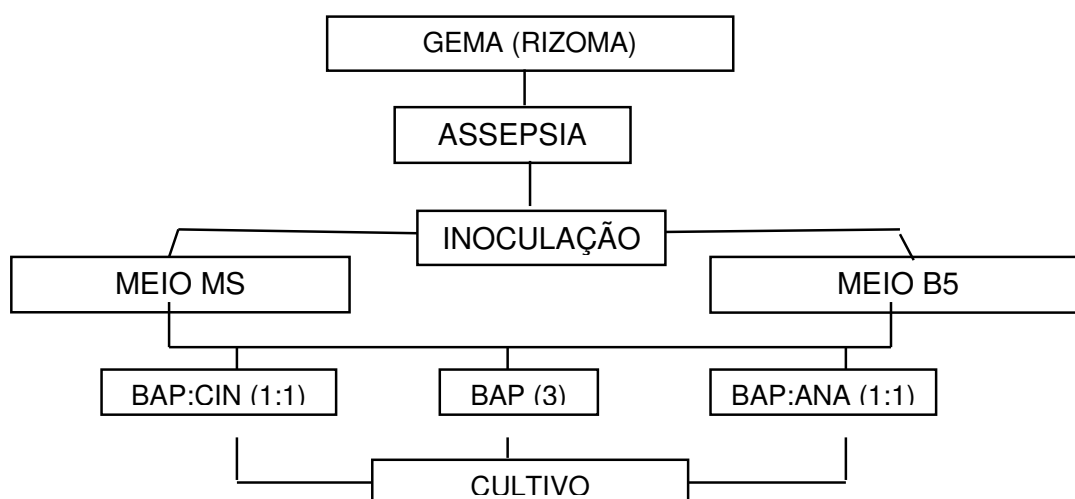


Figura III.1. Fluxograma para estudo da influência do meio de cultura (Murashige-Skoog – MS e Gamborg - B5) e de reguladores de crescimento no estabelecimento das gemas de cúrcuma *in vitro*. BAP = benzilaminopurina; CIN = cinetina; ANA = ácido naftaleno acético.

Após a seleção do meio de cultivo com o maior número de gemas viáveis, foram avaliadas diferentes concentrações e proporções de reguladores de crescimento para o estabelecimento da cultura *in vitro* de acordo com os dados da literatura consultada e testes preliminares (tabela III.1).

Tabela III.1. Diferentes tipos e concentrações de reguladores de crescimento utilizados no estabelecimento do cultivo de cúrcuma *in vitro*

Ensaio	Concentração dos reguladores de crescimento (mg/L)		
	BAP	CIN	ANA
1	1,0	1,0	--
2	--	1,0	1,0
3	--	1,0	0,5
4	1,0	--	1,0
5	1,0	--	--
6	3,0	--	--
7	--	1,0	--

BAP = benzilaminopurina; CIN = cinetina; ANA = ácido naftaleno acético.

As plântulas obtidas a partir do cultivo *in vitro* com o regulador de crescimento que proporcionou melhores resultados foram levadas para multiplicação em meio MS no Laboratório de Cultura de Tecidos e Plantas Medicinais da Universidade Federal de Lavras. Após a obtenção do número desejáveis de plantas, estas foram aclimatizadas em casa de vegetação com umidade relativa de 90% a 25 °C durante 4 semanas em vasos contendo o produto comercial Plantmax (Eucatex-Agrícola, SP) na proporção de 1:1. Posteriormente, foram transplantadas para o Horto Medicinal da Universidade Federal de Lavras. Os rizomas obtidos foram lavados, fatiados, secos em estufa a 60 °C, pó 12 horas, triturados e tamisados em tamis de 40 mesh. A cúrcuma em pó obtida foi caracterizada físico-quimicamente.

2.2.2. Estudo da influência de reguladores de crescimento na indução de calos e de raízes durante o cultivo *in vitro* da cúrcuma em meio MS

Para a indução de calos e de raízes, foram utilizados como fonte de explante fragmentos da base do caule das plântulas provenientes do cultivo *in vitro*, pesando aproximadamente 40 mg para os calos e 30 mg para as raízes. O meio de cultivo MS foi preparado, adicionando-se os reguladores de crescimento BAP, ANA, e ANA/BAP, em diferentes concentrações (tabela III.2). No caso das raízes, o meio foi fragmentado para maior aeração. Após a inoculação dos explantes em capela de fluxo laminar, os frascos foram vedados e conduzidos à sala de cultivo. A seqüência das operações está representada na Figura III. 2.

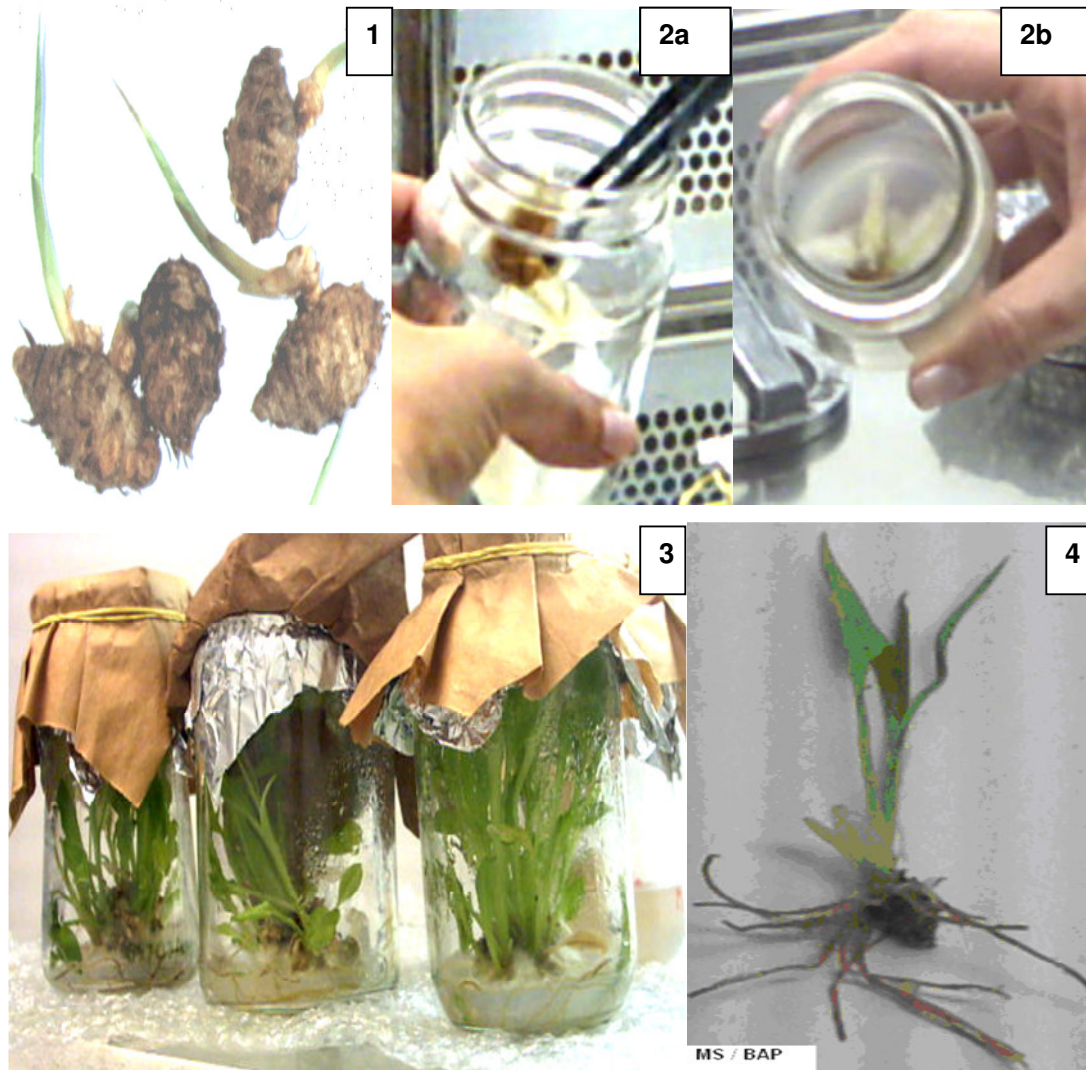


Figura III.2. Etapas do cultivo da cúrcuma *in vitro* para o estabelecimento da cultura: (1) gemas (explante primário) utilizados para a retirada do explante; (2a e 2b) manipulação da plântula para distribuição entre os meios avaliados (3) plântula no meio de cultivo; (4) plântula desenvolvida após 60 dias.

A formação de calos e raízes foi conduzida a 25 ± 2 °C, e na ausência de luz (SALVI et al., 2002), sendo o desenvolvimento avaliado aos 60 dias de cultivo, ao fim deste período os frascos foram abertos e os calos e raízes foram retiradas e pesadas. Foram realizados testes preliminares que permitiram a escolha das dosagens dos reguladores de crescimento.

Tabela III.2. Diferentes concentrações de reguladores de crescimento utilizados nos ensaios na indução de calo e raízes durante cultivo *in vitro* da cúrcuma em meio MS

Ensaio	Concentração dos reguladores de crescimento (mg/L)	
	BAP	ANA
1	0,25	1,75
2	--	1,0
3	--	2,0
4	--	3,0
5	1,0	--
6	--	--

BAP = benzilaminopurina; ANA = ácido naftaleno acético.

2.2.3. Estudo da influência de diferentes concentrações de KNO₃ e KCl no desenvolvimento de calos e raízes

O estudo da influência da concentração de nitrato de potássio (KNO₃) na formação de calos e raízes foi realizado em meio MS utilizando-se a concentração e o regulador de crescimento que proporcionou maior formação de calos e raízes. Como o meio MS possui originalmente em sua composição 1,9 g/L de KNO₃, o experimento foi conduzido em triplicata, nas concentrações de 2,1 e 2,3 g/ de KNO₃, sendo o controle, aquele com a concentração do meio original. Com relação ao KCl, foram incorporados ao meio 0,0; 0,75 e 1,5 mg/L, sendo o experimento também conduzido em triplicata.

A formação de calos e raízes foi conduzida a 25 ± 2 °C, na ausência de luz (SALVI et al., 2002), sendo o desenvolvimento avaliado aos 60 dias de cultivo. Ao fim deste período os frascos foram abertos e os calos e raízes retirados e pesados.

2.2.4. Estudo da influência de diferentes concentrações de KNO₃ e KCl na produção de pigmentos curcuminóides nos calos e raízes

Fragmentos da base do caule foram colocados em meio MS acrescido de 1,9; 2,1 e 2,3 g/L de KNO₃ e de 0,00; 0,75 e 1,5 mg/L de KCl, sendo o experimento conduzido em triplicata.

A formação de calos e raízes foi conduzida a 25 ± 2 °C, na ausência de luz (SALVI et al., 2002), sendo o desenvolvimento avaliado aos 60 dias de cultivo. Ao fim deste período os frascos foram abertos e os calos e raízes retirados e analisados quanto aos teores de pigmentos curcuminóides.

2.2.5. Estudo da influência de diferentes concentrações de KNO₃ e KCl na produção de óleos essenciais nos calos e raízes

Fragmentos da base do caule foram colocados em meio MS acrescido de 1,9; 2,1 e 2,3 g/L de KNO₃ e de 0,00; 0,75 e 1,5 mg/L de KCl, sendo o experimento também conduzido em triplicata.

A formação de calos e raízes foi conduzida a 25 ± 2 °C, na ausência de luz (SALVI et al., 2002), sendo o desenvolvimento avaliado aos 60 dias de cultivo. Ao fim deste período os frascos foram abertos e os calos e raízes retirados e analisados quanto ao perfil cromatográfico do óleo essencial.

2.3. MÉTODOS DE ANÁLISE

2.3.1. Determinação do desenvolvimento da cultura de célula *in vitro*

Para avaliação da influência do meio de cultivo e de reguladores de crescimento no estabelecimento das gemas, foram contados o número de brotos formados.

Para a avaliação da influência de reguladores de crescimento e de sais de potássio na formação de calos e de raízes, estes foram retirados do meio e pesados em balança analítica.

2.3.2. Determinação dos pigmentos curcuminóides

As amostras de calos e raízes foram retiradas do meio de cultivo, limpas, secas a 60 ± 2 °C até peso constante, trituradas e tamisadas (40 mesh). Amostras de calos e raízes desidratados (500 mg) e de cúrcuma em pó (20 mg) foram colocadas em erlenmeyers e adicionadas de 100 mL de etanol. As soluções foram mantidas ao abrigo da luz, sob agitação a 155 rpm por 90 minutos e, em seguida, foram filtradas a vácuo em funil de placa porosa. Os filtrados obtidos dos calos e raízes foram concentrados até a obtenção de resíduo, em evaporador rotatório a 40 °C, pesados 0,1 g e levados a um volume de 1 mL. Depois de filtrado em membrana tipo HV de 0,45 µm de tamanho do poro (Millipore Corp, Bedford, MA, EUA), o extrato foi injetado no cromatógrafo.

A determinação dos pigmentos curcuminóides foi feita em CLAE em fase normal e detecção espectrofotométrica a 425 nm. O cromatógrafo líquido de alta eficiência utilizado foi o da Shimadzu (Kyoto, Japão) com injetor Rheodyne (loop de 20 µL), unidade de controle CBM 10AD e detector de arranjo de diodos. A coluna utilizada foi a Shim-Pack CLC-NH₂ (4,6 x 150 mm, partículas esféricas de 5 µm, Shimadzu, Kyoto, Japão). A fase móvel era composta de etanol:água (90:10) a um fluxo de 0,4 mL/min, a 22 ± 1 °C, sendo o tempo de corrida de 12 min.

Os pigmentos foram identificados pelo tempos de retenção comparado aos pigmentos purificados e confirmados pelo espectro no UV-visível. Para o cálculo das concentrações foram utilizados os coeficientes de extinção de cada pigmento (PERET-ALMEIDA et al., 2005).

2.3.3. Determinação do perfil cromatográfico dos óleos essenciais

Os óleos essenciais da cúrcuma em pó foram obtidos por hidrodestilação em aparelho de Clevenger conforme descrito por SILVA et al. (2005). Com relação aos calos e raízes, após a extração dos pigmentos, o material retido na placa porosa foi seco triturado e utilizado na determinação dos óleos essenciais.

Amostras (0,1 g) de cúrcuma em pó, calos e raízes foram colocadas em vidros hermeticamente fechados. Para a adsorção dos voláteis, o frasco foi submetido ao aquecimento a 80 °C durante 5 minutos quando a fibra da seringa do SPME (fibra de 100 µm e cobertura de polidimetilsiloxano, 57300-U, Supelco, PA, EUA) ficou exposta. Ao término deste tempo a fibra foi recolhida e, em seguida, foi realizada a injeção da amostra no cromatógrafo gasoso (MATA et al., 2004).

Os compostos voláteis foram analisados em cromatógrafo gasoso CG-17A com detector de ionização de chamas (Shimadzu, Kyoto, Japão), coluna capilar DB-1 (25 m x 0,32 mm; 0,52 µm); injeção *splitless* e hélio como gás de arraste. O tempo de dessorção da fibra de SPME foi de 15 minutos a 220 °C. A temperatura do injetor foi de 220 °C, a do detector de 250 °C e a programação da temperatura da coluna variou de 60 a 200 °C (tabela III.3). O perfil cromatográfico das amostras foi comparado (TALLON-NETTO, 2004).

Tabela III.3. Gradiente de temperatura empregado nas análises das substâncias voláteis por CG-FID para óleo essencial e para os calos e raízes de cúrcuma

Taxa de aumento(°C/ min)	Temperatura (°C)	Tempo (min)
--	60	5
30	110	10
2	120	20
2	130	15
5	155	1
8	200	3*e10**

* tempo empregado no gradiente para óleos essenciais ; ** tempo empregado no gradiente para calos e raízes. Fonte: TALLON-NETTO (2004).

2.3.4. Determinação das características da cúrcuma em pó obtida dos rizomas cultivados em solo

Rendimento. O rendimento foi determinado pela diferença da biomassa fresca e seca. Para determinar a biomassa seca, o rizoma foi fatiado, seco a 60 °C em estufa com circulação de ar, triturado e peneirado a 40 mesh.

Composição físico-química. A determinação da umidade foi feita por dessecação em estufa a 105 °C, até peso constante. As proteínas foram analisadas pelo método de Kjeldahl, os lípidos por Soxhlet, as cinzas por incineração em mufla a 500 °C e carboidratos foi quantificado por diferença (IAL, 1987). As extrações e determinações dos pigmentos e óleo essencial foram feitas de acordo com PÉRET-ALMEIDA et al. (2005) e SILVA et al. (2005).

2.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a definição do meio de cultivo foi observada a presença de brotos viáveis e não viáveis. Os dados foram analisados utilizando o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, sendo as médias comparadas pelo teste de Dunn. Todos os testes foram realizados com 3 repetições em sextuplicata.

O desenvolvimento dos explantes em meio MS foi avaliado através da contagem de brotos e da pesagem de calos e raízes utilizando blocos inteiramente casualizados e a comparação entre as médias foi feita pelo teste de Tukey a 5%.

Os teores de pigmentos curcuminóides formados em calos e raízes foram comparados pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

A formação de pigmentos curcuminóides e de óleos essenciais foi submetida a análise de regressão a 1% de significância, sendo determinadas as equações com melhor ajuste e as respectivos coeficientes de correlação.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. INFLUÊNCIA DO MEIO DE CULTIVO E DE REGULADORES DE CRESCIMENTO NO ESTABELECIMENTO DE GEMAS E NA PROPAGAÇÃO DA CÚRCUMA

3.1.1. Influência do meio de cultivo no estabelecimento de gemas

Os resultados obtidos no estudo da influência do meio de cultivo na presença dos reguladores de crescimento BAP e ANA no estabelecimento de gemas estão apresentados na tabela III.4. Observou-se diferença significativa ($p < 0,05\%$) entre os tratamentos no estabelecimento de gemas *in vitro*. Os melhores resultados foram obtidos para o meio MS comparado ao B5, independente dos reguladores de crescimento utilizados. Isto pode ser explicado pela maior concentração de nutrientes no meio MS em relação ao B5.

YASUDA et al. (1988), quando compararam o meio MS com o White para o cultivo *in vitro* de diferentes espécies de cúrcuma, também obtiveram melhores resultados com a utilização do meio MS.

Tabela III.4. Influência dos meios de cultivo MS e B5 e de reguladores de crescimento no estabelecimento das brotos de cúrcuma *in vitro*

Reguladores de crescimento ¹	Concentração (mg/L)	Número médio de broto/explantes ²	
		MS	B5
BAP	3,0	0,78 ± 0,02 ^{ax}	0,28 ± 0,01 ^{ay}
BAP/CIN	1,0:1,0	0,44 ± 0,01 ^{bx}	0,17 ± 0,01 ^{ay}
ANA/BAP	1,0:1,0	0,28 ± 0,01 ^{cx}	0,17 ± 0,01 ^{ax}

¹ BAP=benzilaminopurina; CIN =cinetina; ANA = ácido naftaleno acético.

² MS = Murashige & Skoog; B5 = Gamborg. Valores médios com letras diferentes na mesma coluna (abc) e na mesma linha (xy) são significativamente diferentes pelo teste de Dunn a 5% probabilidade.

O estudo sobre a influência de diferentes reguladores de crescimento em meio MS mostrou haver diferenças significativas e indicou o BAP como o mais adequado para o estabelecimento das gemas. Além disto, observou-se que, com este regulador de crescimento, o início da brotação ocorreu aos 12 dias de cultivo, quando pequenas gemas começaram a surgir. NAYAK & NAIK, (2006) observaram que com 15 dias os brotos houve o crescimento de até 3 a 4 brotos utilizando 13,3 µM de BA. Para o meio B5, entretanto, não foram encontrados relatos de trabalhos anteriores com a *Curcuma longa*, para a comparação de resultados.

3.1.2. Influência dos reguladores de crescimento em meio de cultivo Murashige-Skoog no estabelecimento de gemas

Os resultados obtidos no estudo para a definição das melhores combinações e concentrações de reguladores de crescimento no estabelecimento de gemas estão indicados na tabela III.5.

As gemas, quando cultivadas em meio de cultura sem reguladores de crescimento (controle), desenvolveram poucos brotos em algumas das replicatas, com forte dominância apical. Quando colocadas na presença de citocininas, as gemas apareceram rapidamente e produziram ramificações (brotos secundários e terciários) que originaram um aumento de biomassa, resultando numa grande produção de plantas.

Tabela III.5. Influência de diferentes reguladores de crescimento no desenvolvimento de brotos a partir das gemas de cúrcuma em meio MS

Reguladores de crescimento ¹	Conc (mg/L)	Número de brotos ²	
		Média/gema	Total/tratamento
BAP	3,0	2,50 ^a	60
BAP	1,0	2,08 ^b	50
BAP:ANA	1,0:1,0	1,92 ^b	46
BAP:CIN	1,0:1,0	1,33 ^{bc}	32
CIN:ANA	1,0:1,0	0,86 ^c	15
Controle	--	0,63 ^c	24

¹ BAP = benzilaminopurina; CIN = cinetina; ANA = ácido naftaleno acético.

² Valores médios com letras diferentes são estatisticamente diferentes pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

A partir dos dados apresentados verificou-se que o emprego da citocinina BAP, na presença ou não de outro regulador de crescimento, possibilitou um melhor desenvolvimento da plântula da cúrcuma. Com o uso de BAP houve, além da formação

dos brotos, o aparecimento de raízes, o que facilitou sua aclimatização. Estudos realizados por MELLO et al. (2000) também relataram a eficiência de BAP na propagação da *Curcuma zerdoaria*, e na regeneração das plântulas de *Zingiber officinale*, respectivamente. BALANCHANDRAM et al. (1990) e SALVI et al. (2002) confirmaram a eficiência de BAP na multiplicação da *Curcuma longa* L. De acordo com HESS (1975), este regulador promove a multiplicação das células e o alongamento dos tecidos vegetais, propiciando, o desenvolvimento da plântula a partir de um explante.

Quando utilizado isoladamente, o BAP forneceu melhores resultados na concentração de 3,0 mg/L. Resultados semelhantes foram obtidos por BALANCHANDRAM et al. (1990) na multiplicação de explantes de cúrcuma. Os resultados da combinação de diferentes combinações de reguladores de crescimento em meio MS podem ser vistos na Figura. III 3. No presente trabalho foi observado um o aparecimento de gemas e desenvolvimento de brotos em menos tempo quando comparado aos estudos anteriores.

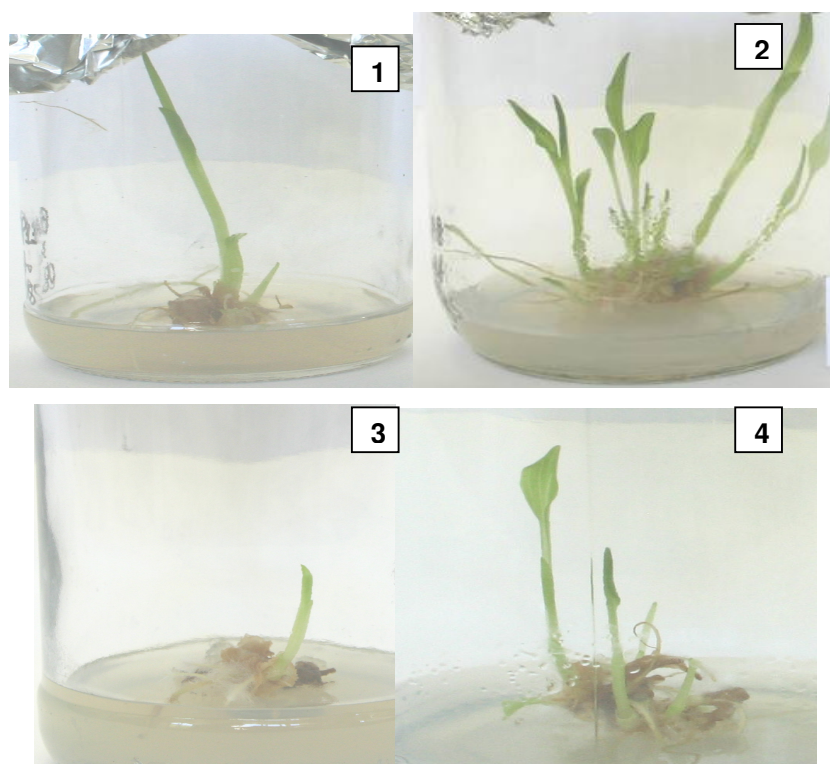


Figura III.3. Desenvolvimento obtido das combinações e concentrações de reguladores de crescimento –benzilaminopurina (BAP) e o ácido naftaleno acético (ANA) e cinetina (CIN) na otimização do estabelecimento de gemas: (1)1,0 mg/L benzilaminopurina - BAP ; (2) 3,0 mg/L BAP; (3)1,0:1,0 mg/L, BAP:ANA e (4)1,0:1,0 mg/L, BAP:CIN.

3.1.3. Cultivo de plantas e caracterização dos rizomas produzidos

As plântulas obtidas em meio MS na presença de 3,0 mg/L de BAP foram cultivadas em solo no Horto Medicinal da Universidade Federal de Lavras, seguindo-se as etapas ilustradas na Figura III.4. Ao final de 10 meses, as plantas forneceram rizomas agrupados e organizados com um peso médio de 220 g/planta (Figura III.5), sendo um maior, central, e arredondado. Ao redor deste, observou-se uma estrutura ramificada, com rizomas menores, cilíndricos denominados secundários. Os rizomas secundários, numa média de 22 rizomas/planta, possuíam 4 a 7 cm de comprimento e pesavam de 5 a 12 gramas. Estrutura semelhante foi descrita por HERTWIG (1986). Os resultados observados estão de acordo com os estudos realizados por CECÍLIO FILHO et al. (2000). Os rizomas frescos foram processados e transformados em pó produzindo 21% para cada 100 g de rizoma processado, superior ao obtido por BAMBIRRA et al. (2002), que foi de 14,5% e de TALLON-NETTO (2004). Um dos fatores que podem ter determinado esta diferença foi o tipo de cultivo além da idade do rizoma processado. A composição centesimal, os teores de pigmentos curcuminóides e os de óleos essenciais da cúrcuma em pó produzida, estão indicadas na tabela III.6.

Tabela III.6. Composição centesimal e teores de pigmentos curcuminóides e de óleos essenciais da cúrcuma em pó obtida da planta propagada *in vitro* em meio MS contendo 3,0 mg/L BAP

Componentes	Teor \pm desvio padrão (g/100 g)
Umidade	10,26 \pm 0,37
Proteína	10,29 \pm 0,03
Lipídeos	8,41 \pm 0,12
Carboidratos+ fibras*	56,11
Cinzas	7,87 \pm 0,02
Pigmentos	11,80 \pm 0,24
Óleos essenciais	5,58 \pm 0,20

* calculados por diferença.

O teor de umidade obtido está de acordo com o valor citado pela European Spice Association (ESA, 2004) de 10 g/100 g. Os valores de pigmentos e óleos essenciais encontrados na tabela acima podem estar associados ao fato da planta ter sido originada de uma cultura *in vitro*, sem a ocorrência de doenças, proporcionando uma planta mais sadia e vigorosa. De acordo com HESS (1975) e MALAVOLTA et al. (1997), a produção de metabólitos primários e secundários pode ser favorecida ao se utilizar cultivo *in vitro*.



Figura III.4. Etapas do cultivo em solo da cúrcuma: plântula obtida no cultivo *in vitro*(1); cultivo dos brotos em vasos e manutenção na casa de vegetação para aclimação (2) e cultivo no solo (3 e 4).

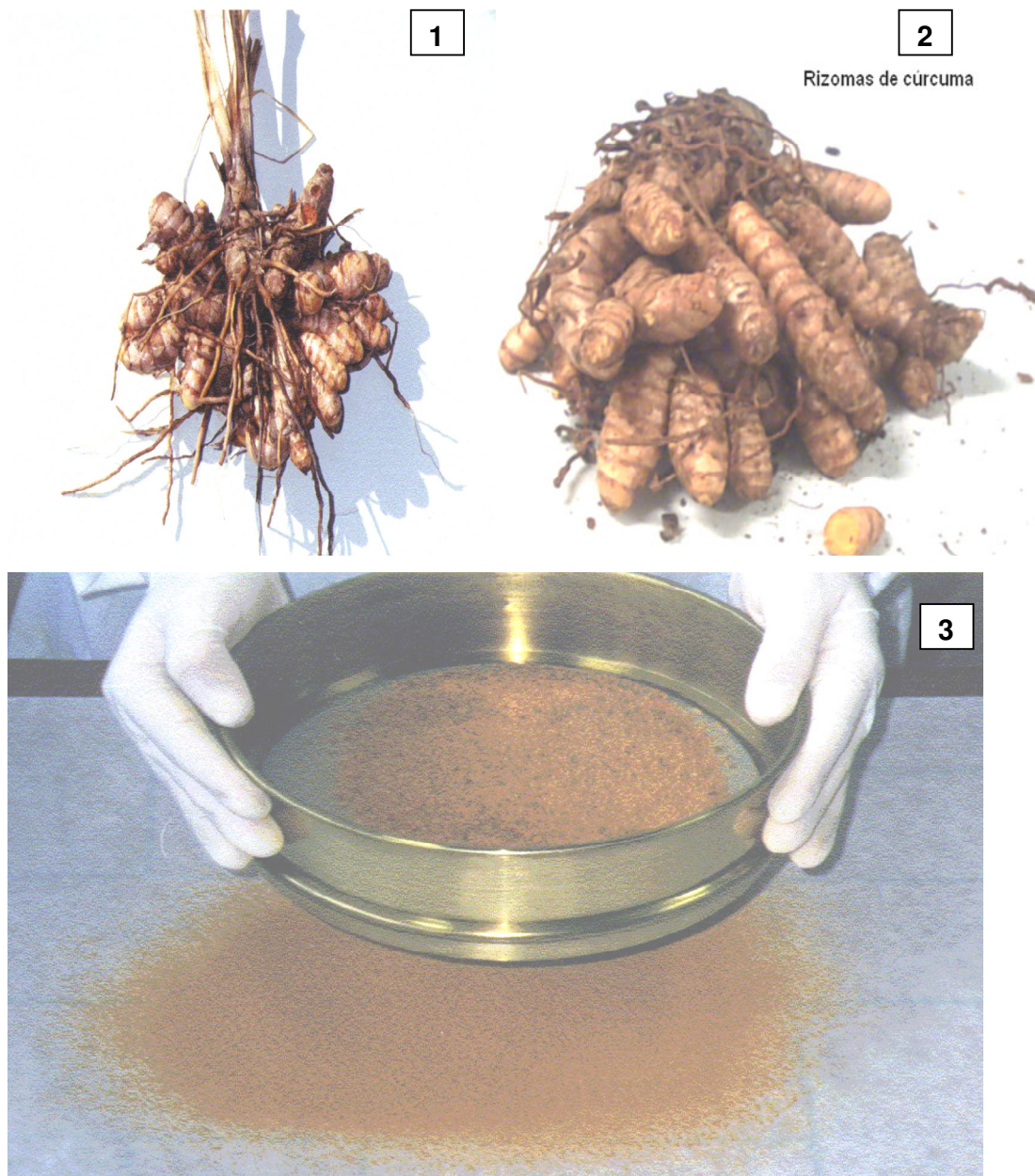


Figura III.5. Estrutura dos rizomas colhidos(1) e (2); pó obtido após o processamento dos rizomas(3).

Do total de pigmentos encontrados no rizoma originado da amostra obtida do cultivo *in vitro*, obteve-se por cromatografia líquida de alta eficiência (Figura III.6), 57,10% de curcumina, 20,65% de desmetoxicurcumina e 22,25% de bisdesmetoxicurcumina. Estes valores indicaram a curcumina como o pigmento presente em maior quantidade, característica observada por PERET-ALMEIDA (2000) e TALLON-NETTO (2004).

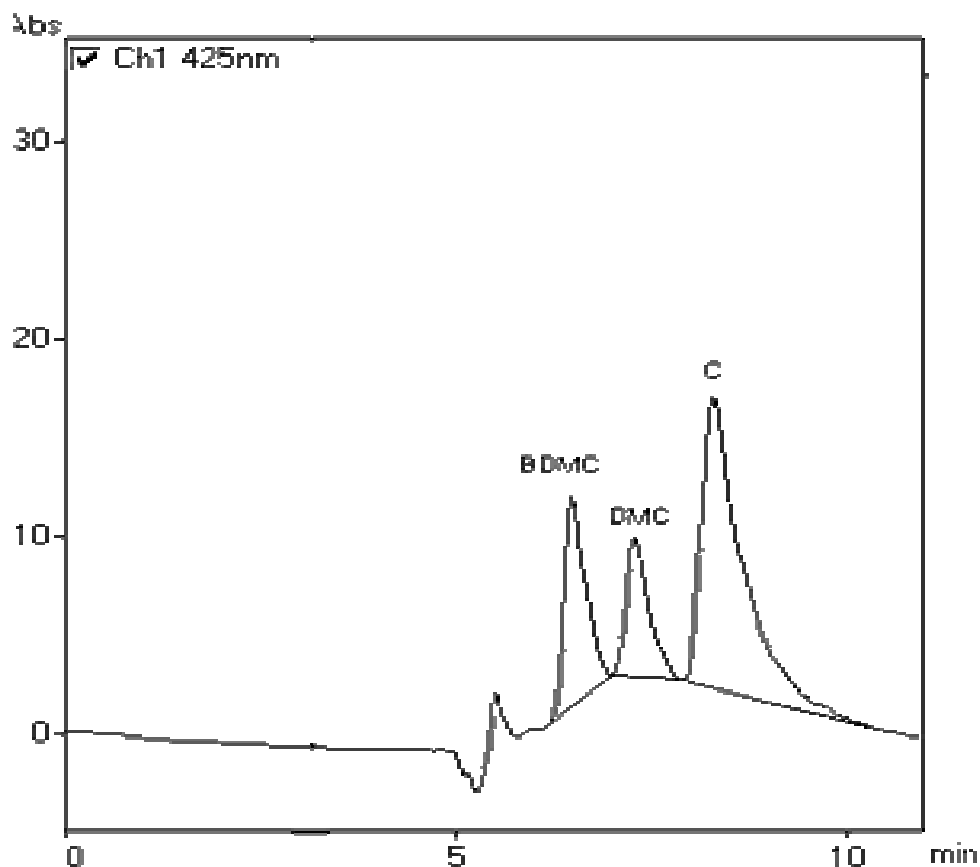


Figura III.6. Perfil cromatográfico, obtido por CLAE, dos pigmentos curcuminóides extraídos da cúrcuma em pó obtida de rizomas da cultura estabelecida *in vitro*. CLAE, coluna Shim-Pack CLC-NH₂ (4,6 x 150 mm), fase móvel etanol:água (90:10), fluxo de 0,4 mL/min, 12 min de corrida (C = curcumina, DMC = desmetoxicurcumina e BDMC = bisdesmetoxicurcumina).

Os óleos essenciais, obtidos por hidrodestilação, em aparelho de Clevenger, apresentaram coloração amarela clara e aspecto translúcido, com densidade de 0,9120 g/L. O perfil obtido por cromatografia gasosa e apresentado na Figura III.7 é semelhante ao encontrado por TALLON-NETTO (2004).

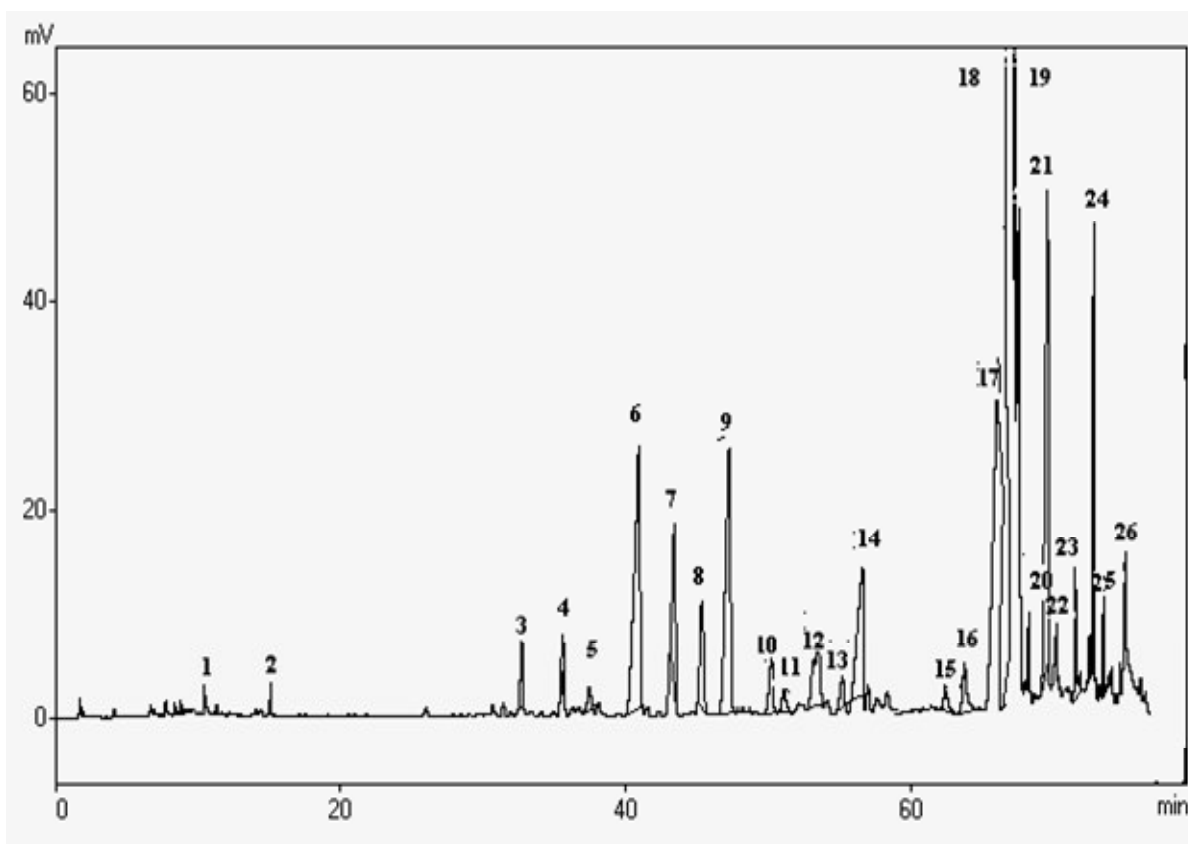


Figura III.7 Perfil cromatográfico dos óleos essenciais extraídos da cúrcuma estabelecida *in vitro*.

SPME-CG-FID, coluna capilar DB-1 (25 m x 0,32 mm; 0,52 μm), fibra de polidimetilsiloxano; gás de arraste = He, injeção *splitless*,; adsorção 5 minutos a 80 °C; dessorção 15 minutos a 220 °C. Temperatura do injetor 220 °C, detector a 250 °C, programação da temperatura da coluna variou de 60 °C a 200 °C (Pico 1 = limoneno; Pico 2 = borneol; Pico 17 = ar-turmerona).

3.2. INFLUÊNCIA DOS REGULADORES DE CRESCIMENTO NA INDUÇÃO DE CALOS E RAÍZES DA CÚRCUMA EM MEIO DE CULTIVO MS

Os calos obtidos apresentaram coloração esbranquiçada, tendo sido observada uma estrutura mais firme em sua superfície (Figura III.8). As raízes estão indicadas na Figura III.9. O desenvolvimento das raízes foi facilitado promovendo cortes no meio sólido, com o objetivo de criar espaços para o desenvolvimento da raiz.

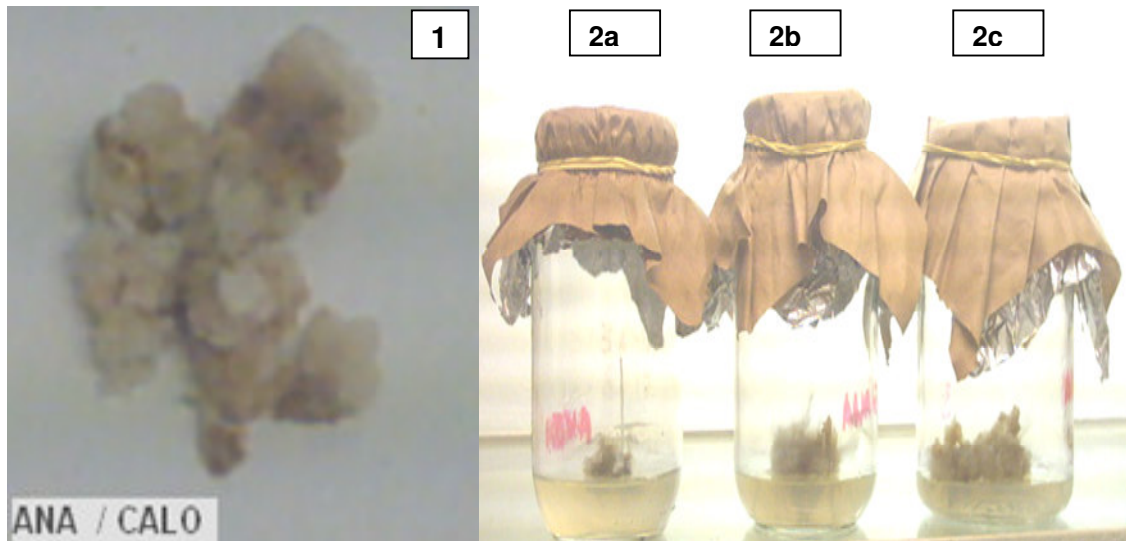


Figura III.8. Aspecto do calo obtido do cultivo de explante em meio MS e regulador de crescimento ANA (1) e a Seqüência com diferentes concentrações de ANA 1,0 (2a); 2,0(2b) e 3,0 mg/L(2c)

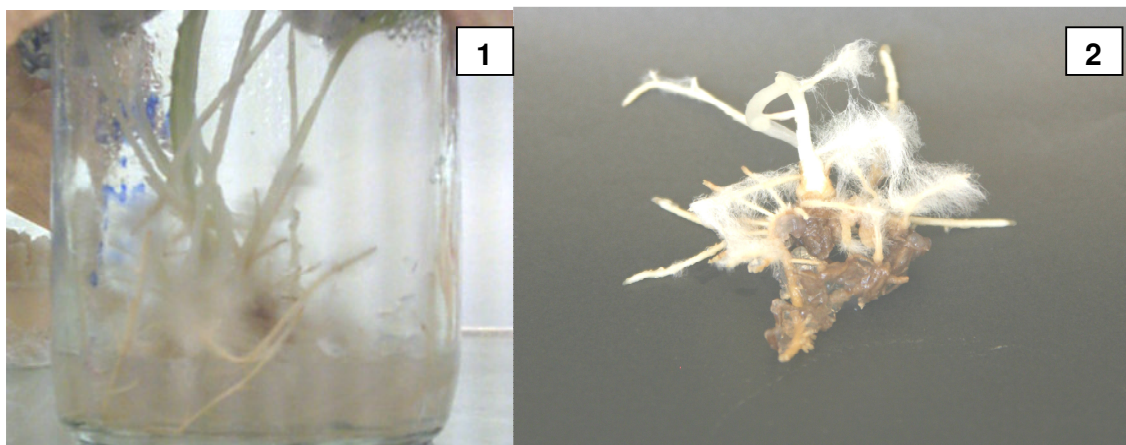


Figura III.9. Raízes obtidas do cultivo de explante em meio MS(1) e Regulador de crescimento ANA no cultivo *in vitro* e aspecto da raízes (2).

Os resultados obtidos ao se utilizar os reguladores de crescimento ANA e BAP em diferentes concentrações em meio MS na indução de calos e raízes estão apresentados na Tabela III.7. Observou-se que no meio controle, ou seja, na ausência de BAP e ANA, não houve indução de calos e apenas uma pequena indução de raízes. Resultados semelhantes foram observados utilizando-se o BAP na ausência de ANA tratamento 5 e no tratamento 1. O uso da auxina ANA favoreceu a indução de calos e raízes, quando nas concentrações de 2,0 e 3,0 mg/L. O efeito positivo das auxinas para o enraizamento de brotos foi reportado por SALVI et al. (2000). Segundo estes autores, a indução de raízes de *Curcuma longa* L. foi observada em meio MS adicionado de 0,1 mg/L de ANA.

Tabela III.7. Influência dos reguladores de crescimento na indução de calos e raízes de cúrcuma em meio MS

Tratamento	Reguladores de crescimento ¹ (mg/L)		Formação (%)	
	BAP	ANA	Raízes	Calos
1	0,25	1,75	20	0
2	--	1,0	60	80
3	--	2,0	80	100
4	--	3,0	80	100
5	1	--	20	0
6	--	--	20	0

¹ BAP = benzilaminopurina; ANA = ácido naftaleno acético.

3.3. INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DOS SAIS DE POTÁSSIO NO DESENVOLVIMENTO DE CALOS E RAÍZES EM MEIO MS, NA PRESENÇA DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE ANA

A partir do estudo anterior foi escolhido o regulador de crescimento ANA, nas concentrações de 1,0; 2,0 e 3,0 mg/L para a condução dos demais experimentos. A intensidade da biomassa seca e a coloração do calo foram os parâmetros usados na escolha do explante.

3.3.1. Influência das concentrações de KNO₃, de KCl e de ANA no meio de cultivo MS no desenvolvimento de calos

O desenvolvimento de calos, determinado pela biomassa seca adquirido aos 60 dias de cultivo em meio MS na presença de diferentes concentrações de KNO₃ estão apresentados na tabela III.8. Os tratamentos que proporcionaram maior desenvolvimento dos calos foram aqueles contendo 2,1 g/L de KNO₃, independente da concentração de ANA, e aquele contendo 2,3 g/L de KNO₃ e ANA na concentração de 1,0 mg/L.

Tabela III.8. Influência da concentração de KNO₃ no desenvolvimento de calos de cúrcuma *in vitro* em meio MS contendo diferentes concentrações de ANA

Tratamentos	KNO ₃ (g/L)	ANA ¹ (mg/L)	Biomassa dos calos ² (mg)
1	1,9	1,0	2,94 ± 0,25 ^{bc}
2	1,9	2,0	2,80 ± 0,05 ^c
3	1,9	3,0	3,37 ± 0,10 ^b
4	2,1	1,0	4,05 ± 0,22 ^{ab}
5	2,1	2,0	4,10 ± 0,17 ^{ab}
6	2,1	3,0	4,23 ± 0,11 ^a
7	2,3	1,0	4,00 ± 0,18 ^{ab}
8	2,3	2,0	2,36 ± 0,13 ^c
9	2,3	3,0	0,91 ± 0,23 ^d
10 (controle)	--	--	0,09 ± 0,01 ^e

¹ ANA = ácido naftaleno acético.

² Valores médios com letras diferentes são diferentes pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

As biomassas secas dos calos obtidos após 60 dias de cultivo de explante, na presença de diferentes concentrações de KCl em meio MS, com diferentes teores de ANA, estão apresentados na tabela III.9. Observou-se que as condições que proporcionaram um desenvolvimento de calos significativamente maiores foram na ausência de KCl e 3,0 mg/L de ANA e também com 0,75 de KCl e 1,0 mg/L de ANA e o aumento na concentração de KCl, promoveu uma redução significativa no desenvolvimento de calos. As fotos da Figura III. 11 ilustram os resultados encontrados.

Tabela III.9. Influência da concentração de KCl e do regulador de crescimento ANA no desenvolvimento de calos de cúrcuma *in vitro* em meio MS

Tratamentos	KCl (g/L)	ANA ¹ (mg/L)	Peso dos calos ² (mg)
1	--	1,0	1,12 ± 0,09 ^c
2	--	2,0	1,14 ± 0,24 ^c
3	--	3,0	1,65 ± 0,22 ^b
4	0,75	1,0	2,03 ± 0,13 ^a
5	0,75	2,0	0,75 ± 0,19 ^d
6	0,75	3,0	0,51 ± 0,09 ^d
7	1,5	1,0	0,52 ± 0,08 ^d
8	1,5	2,0	0,43 ± 0,14 ^d
9	1,5	3,0	0,34 ± 0,08 ^{de}
10 (controle)	--	--	0,09 ± 0,01 ^e

¹ ANA = ácido naftaleno acético. ² Valores médios com letras diferentes são estatisticamente diferentes pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Por outro lado, um aumento na concentração de KCl de 0,0 a 1,5 mg/L causou uma diminuição na formação de calos nos tratamentos contendo o regulador de crescimento ANA nas concentrações de 2,0 e 3,0 mg/L. Nas amostras adicionadas de ANA a 1,0 mg/L

houve um aumento na formação de calos com o incremento na concentração de KCl, obtendo-se uma produção máxima a 0,75 mg/L, diminuindo posteriormente.

Baseado nos resultados obtidos, a presença do regulador de crescimento ANA foi essencial para o desenvolvimento de calos em cultura de cúrcuma *in vitro*. Entretanto, com relação ao potássio, apesar de ser reconhecido o papel benéfico no metabolismo das plantas e no desenvolvimento de calos (LAVEE & HOFFMAN, 1971), a forma de adição (tipo de sal) e a concentração utilizada afetaram significativamente o desenvolvimento de calos de cúrcuma *in vitro*. Na forma de KNO_3 , o potássio, na concentração de 2,1 g/L, favoreceu a formação de calos, especialmente quando foi utilizado 3,0 mg/l de ANA (Figura III 10; Foto 4) . Por outro lado, na forma de KCl, a adição do íon afetou o desenvolvimento de calos de forma distinta, dependendo da concentração do regulador de crescimento ANA adicionado. LAVEE & HOFFMAN (1971) reportaram que a concentração ideal para o desenvolvimento de calo no cultivo de maçã *in vitro* foi de 3,5 mM de íons potássio, valores maiores ou menores tornaram o crescimento menos vigoroso. No caso da cúrcuma, nas concentrações utilizadas, a condição ideal para o desenvolvimento de calos seria 2,1 g/L de KNO_3 (0,2 g/L a mais em meio MS) e 1,0 mg/L de ANA.

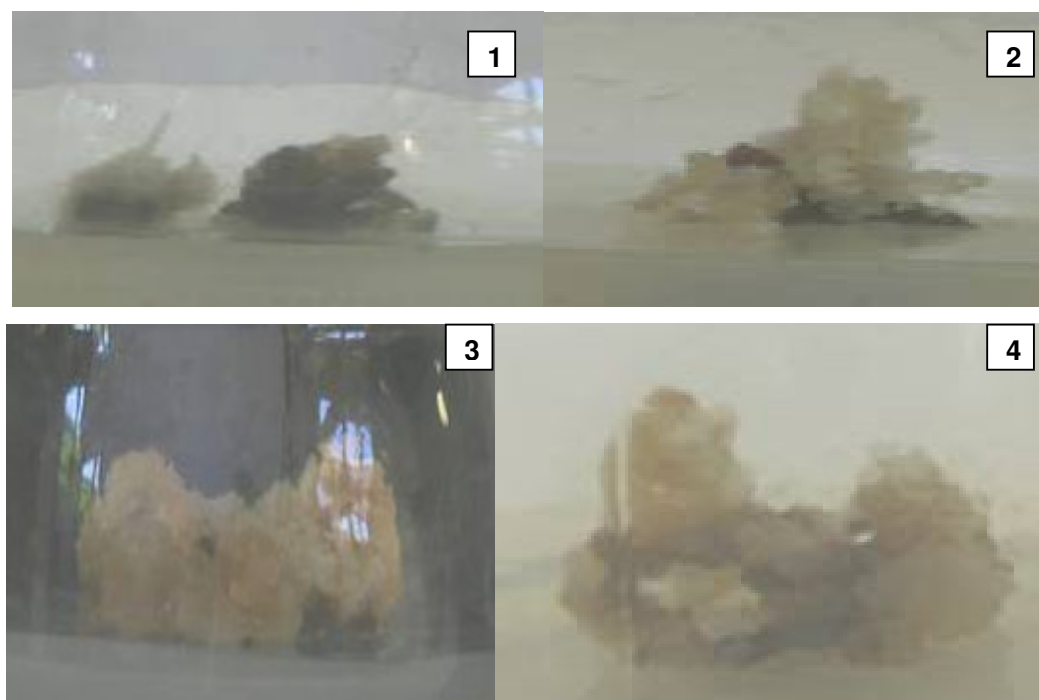


Figura III.10. Calos obtidos no cultivo *in vitro* da cúrcuma utilizando diferentes concentrações de KNO_3 e três concentrações de ANA.

Na seqüência: (1) controle - cultura com 1,9 g/L de KNO_3 sem ANA; (2) 2,1 g/L de KNO_3 com ANA 1,0 mg/L; (3) 2,1 g/L de KNO_3 com ANA 2,0 mg/L e (4) 2,1 g/L de KNO_3 com ANA 3,0 mg/L.

3.3.2. Influência das concentrações de KNO₃ e de KCl no desenvolvimento de raízes

As biomassas secas das raízes obtidas utilizando diferentes concentrações de KNO₃ em meio MS contendo três concentrações de ANA, estão indicados na tabela III.10. Entre todos os tratamentos o meio MS com 1,9 g/L de KNO₃ e 3,0 mg/L de ANA, foi o mais eficiente no desenvolvimento das raízes diferindo significativamente dos demais.

As raízes obtidas no meio MS adicionado de diferentes concentrações de KCl, após o período de 60 dias de cultivo, apresentaram as biomassas indicadas na tabela III.11. A maior concentração de KCl adicionada (1,5 mg/L) forneceu biomassa significativamente maiores, independente da concentração de ANA utilizada. Resultados semelhantes foram obtidos ao se utilizar uma concentração intermediária de KCl (0,75 mg/L) e 2,0 mg/L de ANA.

Tabela III.10. Influência da concentração de KNO₃ no desenvolvimento de raízes de cúrcuma *in vitro* em meio MS contendo diferentes concentrações de ANA

Tratamentos	KNO ₃ (g/L)	ANA ¹ (mg/L)	Biomassa das raízes ² (mg)
1	1,9	1,0	1,06 ± 0,06 ^{bc}
2	1,9	2,0	1,36 ± 0,12 ^{bc}
3	1,9	3,0	2,77 ± 0,20 ^a
4	2,1	1,0	0,85 ± 0,21 ^{bcd}
5	2,1	2,0	1,50 ± 0,16 ^b
6	2,1	3,0	1,66 ± 0,14 ^b
7	2,3	1,0	1,00 ± 0,03 ^{bc}
8	2,3	2,0	0,88 ± 0,15 ^{bcd}
9	2,3	3,0	0,52 ± 0,05 ^{cd}
10 (controle)	--	1,9	0,09 ± 0,01 ^d

¹ ANA = ácido naftaleno acético.

² Valores médios com letras diferentes são diferentes pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Foi observado que um aumento nos teores de KNO₃ no meio MS não favoreceu o desenvolvimento de raízes. A formação de raízes foi significativamente maior ao se utilizar 1,9 g/L de KNO₃ e 3,0 mg/L do regulador de crescimento ANA conforme Figura III 11.

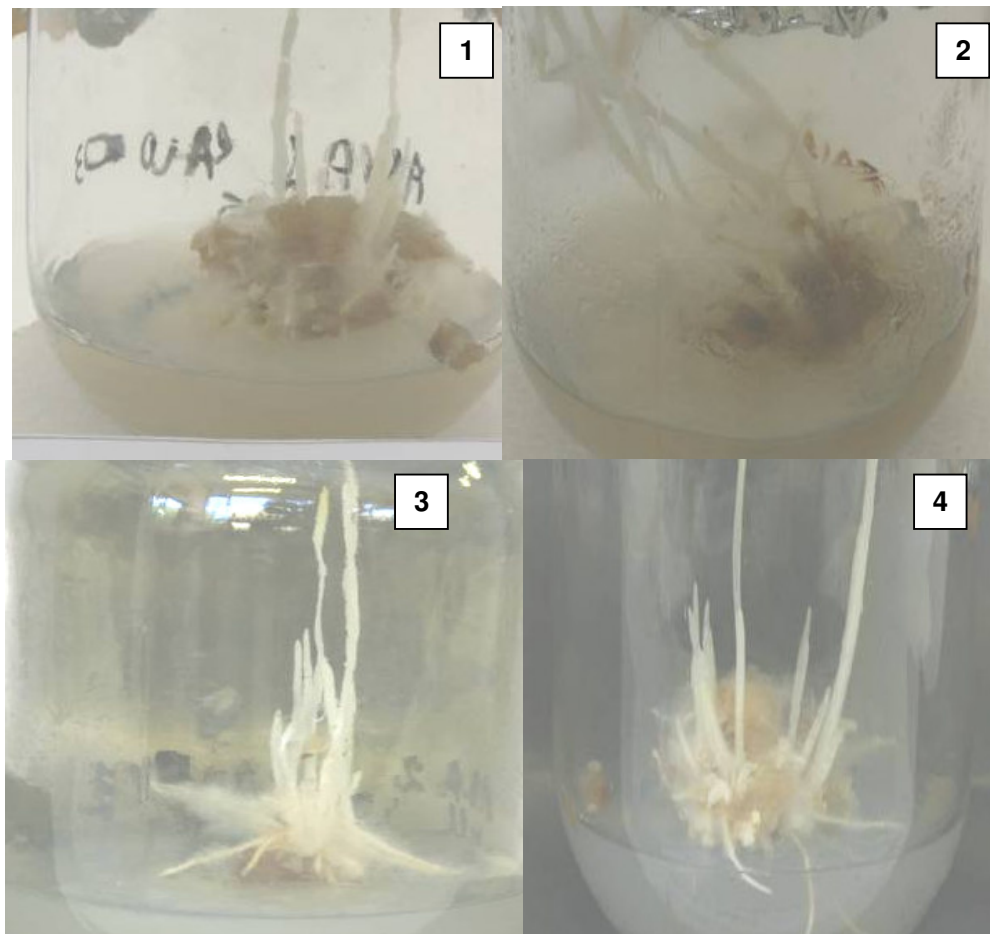


Figura III. 11. Raízes obtidas do cultivo “*in vitro*” utilizando diferentes concentrações de KNO_3 em meio MS contendo três diferentes concentrações de ANA.
Na sequência: (1) controle - MS com 1,9 g/L de KNO_3 ; (2) 2,1 g/L de KNO_3 com ANA 1,0 mg/L; (3) 2,1 g/L de KNO_3 com ANA 2,0 mg/L e (4) 2,1 g/L de KNO_3 com ANA 3,0 mg/L.

Tabela III.11 Influência da concentração de KCl e no desenvolvimento de raízes de cúrcuma *in vitro* em meio MS contendo diferentes concentrações de ANA

Tratamentos	KCl (g/L)	ANA ¹ (mg/L)	Peso dos raízes ² (mg)
1	--	1,0	0,19 ± 0,09 ^d
2	--	2,0	0,95 ± 0,21 ^{bc}
3	--	3,0	1,17 ± 0,06 ^b
4	0,75	1,0	1,21 ± 0,14 ^b
5	0,75	2,0	1,86 ± 0,15 ^a
6	0,75	3,0	1,40 ± 0,06 ^b
7	1,5	1,0	1,58 ± 0,30 ^{ab}
8	1,5	2,0	1,82 ± 0,27 ^a
9	1,5	3,0	1,66 ± 0,07 ^a
10 (controle)	--	0,75	0,09 ± 0,01 ^d

¹ ANA = ácido naftaleno acético.

² Valores médios com letras diferentes são diferentes pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Baseado nos resultados obtidos, o aumento nas concentrações de KNO₃ não favoreceu o desenvolvimento de raízes, por outro lado, quanto maior a concentração de KCl utilizada (1,5 mg/L), maior foi a formação de raízes, independente da concentração de ANA empregada. De acordo com PIETSCH (1998), o KCl age alterando o potencial osmótico da planta. Esta mudança altera a composição nutritiva dos exudatos da raiz no solo que, por sua vez, favorece o desenvolvimento de microrganismos redutores de manganês, benéficos ao desenvolvimento da planta.

Ao utilizar KCl, observou-se que um aumento na concentração deste sal causou um aumento significativo na formação de raízes, sendo que ANA na concentração de 2,0 mg/L e KCl a 0,75 g/L foi a condição ideal para a formação de raízes, Figura III.12.

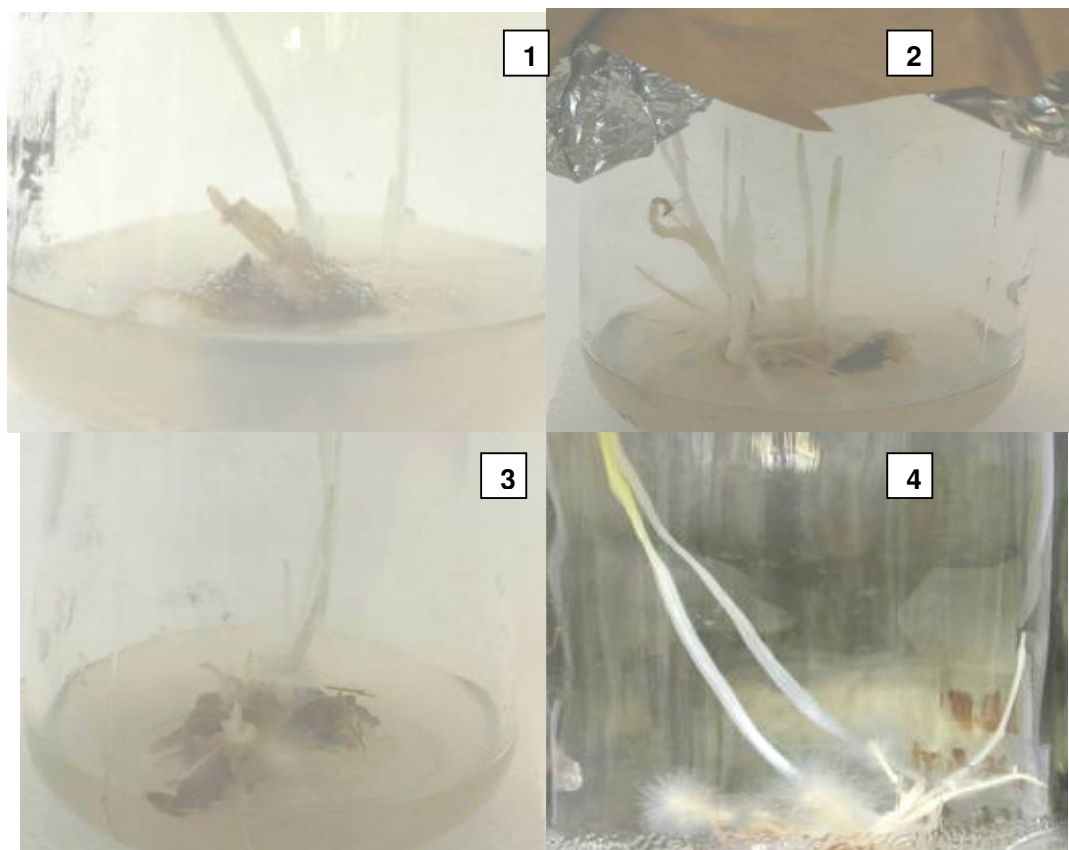


Figura III.12. Raízes obtidas do cultivo “*in vitro*” utilizando diferentes concentrações de KCl em meio MS contendo três diferentes concentrações de ANA.

Na seqüência; (1) 1,5 mg/L de KCl com 1,0 mg/L de ANA; (2) 1,5 mg/L de KCl com 2,0 mg/L de ANA; (3) 1,5 mg/L de KCl com 3,0 mg/L de ANA e (4) controle -MS com 0,75 mg/L .

3.4. INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DE SAIS DE POTÁSSIO EM MEIO MS, NA PRESENÇA DE TRÊS CONCENTRAÇÕES DE ANA NA FORMAÇÃO DE PIGMENTOS CURCUMINÓIDES EM CALOS E RAÍZES

3.4.1. Influência da concentração de sais de potássio (KNO₃ e de KCl) em meio MS na formação de pigmentos curcuminóides em calos

Os teores de pigmentos curcuminóides encontrados em calos formados em meio MS na presença de KNO₃ e de três concentrações do regulador de crescimento ANA, estão apresentados na tabela III.12.

Tabela III.12. Influência da concentração de KNO₃ nos teores de pigmentos curcuminóides em calos produzidos em meio MS na presença de três concentrações do regulador de crescimento ANA

Tratamento	KNO ₃ (g/L)	ANA ¹ (mg/L)	Pigmentos curcuminoides ² (mg/g)			
			C	DMC	BDMC	Total
1	1,9	1,0	3,20 ± 0,02 ^{bx}	1,91 ± 0,02 ^{fy}	1,24 ± 0,02 ^{ez}	6,35 ± 0,02 ^e
2	1,9	2,0	2,45 ± 0,01 ^{dy}	3,11 ± 0,01 ^{cx}	1,60 ± 0,01 ^{bz}	7,16 ± 0,01 ^c
3	1,9	3,0	3,01 ± 0,02 ^{cx}	3,05 ± 0,01 ^{cx}	0,61 ± 0,01 ^{fy}	6,67 ± 0,01 ^d
4	2,1	1,0	2,93 ± 0,02 ^{cx}	2,68 ± 0,01 ^{dy}	1,23 ± 0,01 ^{ez}	6,85 ± 0,01 ^d
5	2,1	2,0	2,50 ± 0,02 ^{dy}	4,30 ± 0,02 ^{bx}	0,76 ± 0,02 ^{fz}	7,56 ± 0,02 ^b
6	2,1	3,0	3,47 ± 0,02 ^{ay}	5,39 ± 0,02 ^{ax}	2,24 ± 0,01 ^{az}	11,10 ± 0,01 ^a
7	2,3	1,0	1,52 ± 0,02 ^{gy}	2,72 ± 0,02 ^{dx}	1,47 ± 0,01 ^{cy}	5,71 ± 0,02 ^f
8	2,3	2,0	1,94 ± 0,01 ^{ey}	2,63 ± 0,01 ^{dx}	1,32 ± 0,01 ^{dz}	5,89 ± 0,01 ^f
9	2,3	3,0	1,74 ± 0,01 ^{fy}	2,04 ± 0,01 ^{ex}	1,49 ± 0,01 ^{cz}	5,26 ± 0,01 ^g
10 (controle)	1.9	--	0,87 ± 0,01 ^{hx}	00 ^{hy}	00 ^{hy}	0,87 ± 0,01 ^h

¹ ANA = ácido naftaleno acético. ² Valores médios com uma mesma letra em uma coluna (a-h) e em uma linha (x-z) não apresentam diferença significativa (teste de Tukey, p > 0,05). C = curcumina, DMC = desmetoxicurcumina, BDMC = bisdesmetoxicurcumina.

Condições cromatográficas: CLAE com coluna Shim-Pack CLC-NH₂ (4,6 x 150 mm), fase móvel etanol:água (90:10), fluxo de 0,4 mL/min, 12 min de corrida.

A distribuição dos pigmentos curcuminóides em relação ao teor total indicou a predominância da curcumina (Tabela III.12 e Figura III.13), conforme demonstrado na literatura para os rizomas da cúrcuma (PERET-ALMEIDA, 2000; TALLON-NETTO, 2004), apenas em alguns tratamentos. Foi observado, também, que a predominância dos demais pigmentos curcuminóides variou em função das concentrações de KNO₃ e de ANA adicionados ao meio MS. A proporção de desmetoxicurcumina ultrapassou a de curcumina ao se utilizar maiores concentrações de KNO₃ e 2,0 mg/L e 3,0 mg/L de ANA. Estes resultados sugerem que as proporções de pigmentos curcuminóides obtidas nos

calos pode ser afetada pela concentração do sal KNO_3 e do regulador de crescimento ANA.

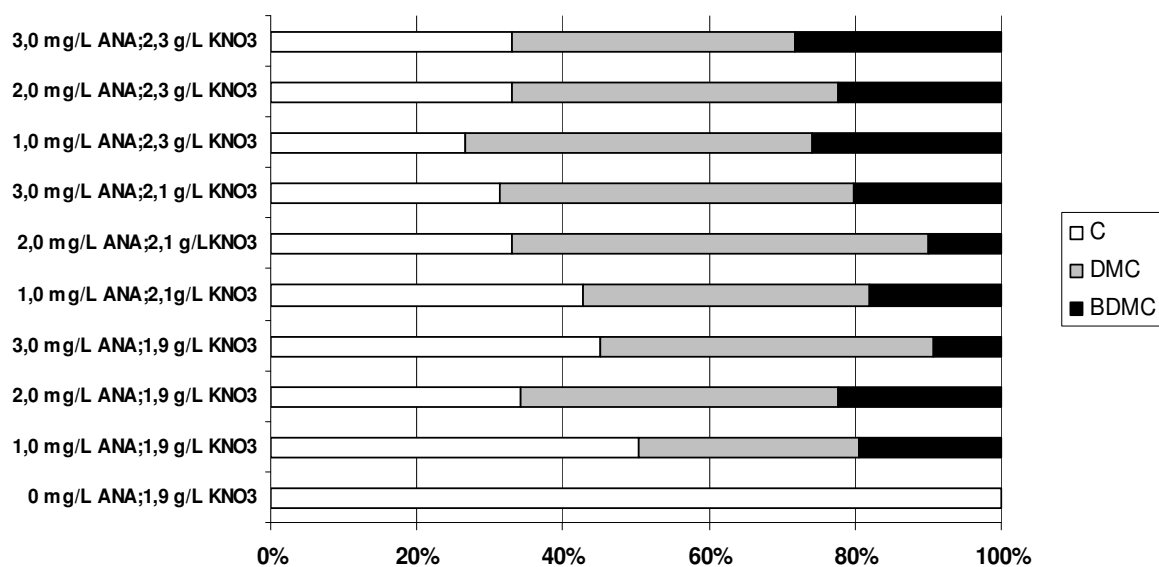


Figura III.13. Proporção de pigmentos curcuminóides encontrados em calos de cúrcuma formados *in vitro* na presença de diferentes concentrações de KNO_3 em meio MS contendo três concentrações do regulador de crescimento ANA (C = curcumina; DMC = desmetoxicurcumina; BDMC = bisdesmetoxicurcumina).

Comparando os diferentes tratamentos na obtenção dos pigmentos curcuminóides, observou-se que na ausência do regulador de crescimento ANA, houve apenas a formação de curcumina no calo, em baixa concentração (Tabela III.12). Entretanto, ao utilizar 2,1 g/L de KNO_3 e 3,0 mg/L de ANA, observou-se a presença de todos os pigmentos curcuminóides significativamente maiores no calo.

Os teores de pigmentos curcuminóides encontrados em calos formados na presença de diferentes concentrações de KCl em meio MS na presença de três concentrações do regulador de crescimento ANA, estão apresentados na tabela III.13. A adição de KCl ao meio MS afetou de forma negativa e diferenciada a formação de cada um dos três pigmentos curcuminóides. Desta forma, a maior produção dos pigmentos ocorreu na ausência deste sal. Confirmou-se, também, que na ausência do regulador de crescimento ANA, houve apenas a formação de curcumina no calo, em baixa concentração. Comparando os diferentes tratamentos na obtenção dos pigmentos curcuminóides, concentrações significativamente maiores de curcumina foram observadas com 1,0 mg/L de ANA; de desmetoxicurcumina e total de pigmentos curcuminóides com 2,0 e 3,0 mg/L de ANA; e de bisdesmetoxicurcumina com 2,0 mg/L de ANA. Conforme indicado na Figura III.14 a curcumina foi o pigmento curcuminóide predominante, exceto para o

tratamento 2 quando a proporção de desmetoxicurcumina ultrapassou a de curcumina e também produzindo a maior concentração de pigmentos de todos os tratamentos.

Tabela III.13. Influência da concentração de KCl nos teores de pigmentos curcuminóides em calos produzidos *in vitro* em meio MS na presença de três concentrações do regulador de crescimento ANA

Tratamento	KCl (mg/L)	ANA ¹ (mg/L)	Pigmentos curcuminoides ² (mg/g)			
			C	DMC	BDMC	Total
1	--	1,0	3,20 ± 0,02 ^{ax}	1,91 ± 0,02 ^{cy}	1,24 ± 0,02 ^{bz}	6,35 ± 0,02 ^b
2	--	2,0	2,45 ± 0,01 ^{cy}	3,11 ± 0,01 ^{ax}	1,60 ± 0,01 ^{az}	7,16 ± 0,01 ^a
3	--	3,0	3,01 ± 0,02 ^{bx}	3,05 ± 0,02 ^{ax}	0,61 ± 0,02 ^{cy}	6,67 ± 0,02 ^a
4	0,75	1,0	1,27 ± 0,01 ^{dx}	2,49 ± 0,01 ^{bx}	0,24 ± 0,01 ^{gx}	2,99 ± 0,01 ^d
5	0,75	2,0	1,34 ± 0,02 ^{dx}	1,87 ± 0,02 ^{dx}	0,42 ± 0,02 ^{dx}	3,63 ± 0,02 ^c
6	0,75	3,0	0,97 ± 0,02 ^{gx}	1,51 ± 0,02 ^{ex}	0,39 ± 0,02 ^{ex}	2,87 ± 0,02 ^d
7	1,5	1,0	0,98 ± 0,02 ^{gx}	1,52 ± 0,02 ^{ex}	0,40 ± 0,02 ^{dx}	2,90 ± 0,02 ^d
8	1,5	2,0	1,17 ± 0,01 ^{ex}	2,02 ± 0,01 ^{bx}	0,66 ± 0,01 ^{cx}	3,90 ± 0,01 ^c
9	1,5	3,0	1,01 ± 0,01 ^{fx}	1,52 ± 0,01 ^{ex}	0,42 ± 0,01 ^{dx}	2,95 ± 0,01 ^d
10 (controle)	--	--	0,87 ± 0,01 ^{hx}	00 ^{fy}	00 ^{hy}	0,87 ± 0,01 ^e

¹ ANA = ácido naftaleno acético. ² Valores médios em uma coluna (a-h) e em uma linha (x-z) com uma mesma letra, não apresentam diferença significativa (teste de Tukey, p > 0,05). C = curcumina, DMC = desmetoxicurcumina, BDMC = bisdesmetoxicurcumina.

Condições cromatográficas: CLAE com coluna Shim-Pack CLC-NH₂ (4,6 x 150 mm), fase móvel etanol:água (90:10), fluxo de 0,4 mL/min. UV visível, limite de detecção 425 nm..

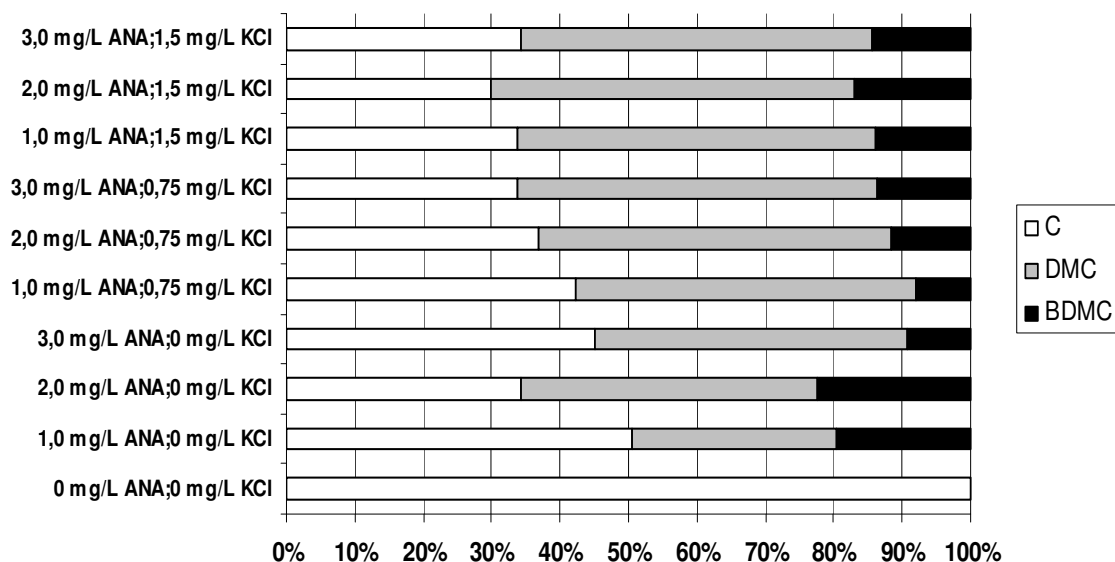


Figura III.14. Proporção de pigmentos curcuminóides encontrados em calos de cúrcuma formados *in vitro* na presença de diferentes concentrações de KCl em meio MS contendo três concentrações de ANA.

(C = curcumina; DMC = desmetoxicurcumina; BDMC = bisdesmetoxicurcumina).

3.4.2. Influência da concentração de sais de potássio (KNO₃ e KCl) em meio MS na formação de pigmentos curcuminóides em raízes

Os resultados do estudo da influência dos sais de potássio nos teores de pigmentos curcuminóides em raízes produzidas em meio MS, em diferentes concentrações do regulador de crescimento ANA estão apresentados na Tabela III.14.

Tabela III.14. Influência da concentração de KNO₃ nos teores de pigmentos curcuminóides em raízes produzidas em meio MS na presença de três concentrações do regulador de crescimento ANA

Tratamento	KNO ₃ (g/L)	ANA ¹ (mg/L)	Pigmentos curcuminóides ² (mg/g)			
			C	DMC	BDMC	Total
1	1,9	1,0	26,4 ± 0,01 ^{bx}	4,76 ± 0,01 ^{fy}	1,24 ± 0,01 ^{ez}	32,35 ± 0,01 ^b
2	1,9	2,0	20,4 ± 0,01 ^{dx}	5,70 ± 0,01 ^{ey}	1,60 ± 0,01 ^{bz}	27,67 ± 0,01 ^c
3	1,9	3,0	19,3 ± 0,02 ^{dx}	7,86 ± 0,02 ^{dy}	0,61 ± 0,02 ^{fz}	27,78 ± 0,02 ^c
4	2,1	1,0	23,7 ± 0,02 ^{cx}	2,52 ± 0,02 ^{hy}	1,23 ± 0,02 ^{ez}	27,47 ± 0,02 ^c
5	2,1	2,0	16,1 ± 0,02 ^{ex}	15,3 ± 0,02 ^{by}	0,76 ± 0,02 ^{fz}	32,21 ± 0,02 ^b
6	2,1	3,0	93,2 ± 0,02 ^{ax}	51,7 ± 0,02 ^{ay}	2,24 ± 0,02 ^{az}	147,1 ± 0,02 ^a
7	2,3	1,0	11,24 ± 0,02 ^{fx}	8,73 ± 0,02 ^{cy}	1,48 ± 0,02 ^{cz}	21,45 ± 0,02 ^d
8	2,3	2,0	8,75 ± 0,02 ^{gx}	3,58 ± 0,02 ^{gy}	1,32 ± 0,02 ^{dz}	13,65 ± 0,02 ^e
9	2,3	3,0	6,89 ± 0,02 ^{hx}	4,56 ± 0,02 ^{fy}	1,49 ± 0,02 ^{cz}	12,93 ± 0,02 ^e
10 (controle)	1,9	--	1,70 ± 0,02 ^{ix}	1,17 ± 0,02 ^{iy}	0,00 ^{gz}	2,86 ± 0,02 ^f

¹ ANA = ácido naftaleno acético. ² Valores médios com uma mesma letra em uma coluna (a-h) e em uma linha (x-z) não apresentam diferença significativa (teste de Tukey, p > 0,05).

C = curcumina, DMC = desmetoxicurcumina, BDMC = bisdesmetoxicurcumina.

Condições cromatográficas: CLAE com coluna Shim-Pack CLC-NH₂ (4,6 x 150 mm), fase móvel etanol:água (90:10), fluxo de 0,4 mL/min, UV visível, limite de detecção 425 nm.

A predominância da curcumina em relação ao teor total dos pigmentos curcuminóides nas raízes foi observada para todos os tratamentos (Tabela III.14 e Figura III.15). Esta foi seguida pela desmetoxicurcumina, e pela bisdesmetoxicurcumina, cuja proporção em relação ao teor total foi menor de 15%.

Com relação aos teores de pigmentos encontrados nas raízes obtidas nas diferentes concentrações de KNO₃, observou-se que para todos os pigmentos curcuminóides, a condição 2,1 g/L de KNO₃ e 3,0 mg/L de ANA foi a mais eficiente para a produção dos três pigmentos.

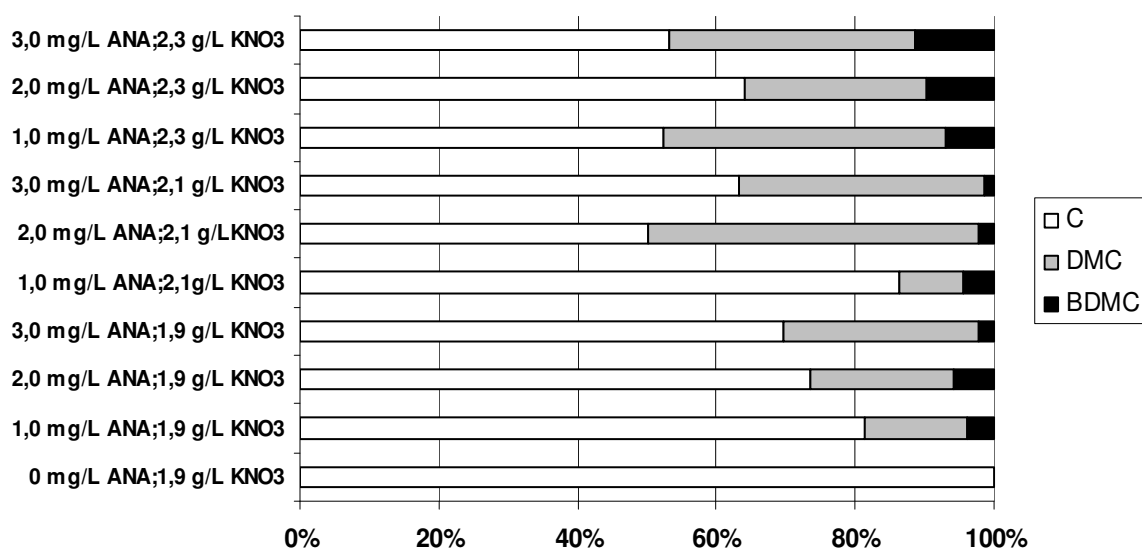


Figura III.15. Proporção de pigmentos curcuminóides encontrados em raízes de cúrcuma formadas *in vitro* na presença de diferentes concentrações de KNO₃ em meio MS contendo três concentrações do regulador de crescimento ANA (C = curcumina; DMC = desmetoxicurcumina; BDMC = bisdesmetoxicurcumina).

Os teores de pigmentos curcuminóides encontrados nas raízes formadas em meio MS contendo diferentes concentrações de KCl na presença de três concentrações regulador de crescimento ANA estão apresentados na tabela III.15.

Tabela III.15. Influência da concentração de KCl nos teores de pigmentos curcuminóides em raízes produzidas em meio MS na presença de três concentrações do regulador de crescimento ANA

Tratamento	KCl (g/L)	ANA ¹ (mg/L)	Pigmentos curcuminoides ² (mg/g)			
			C	DMC	BDMC	Total
1	--	1,0	26,35 ± 0,01 ^{ax}	4,76 ± 0,01 ^{cy}	1,24 ± 0,01 ^{bz}	32,4 ± 0,01 ^a
2	--	2,0	20,36 ± 0,01 ^{bx}	5,70 ± 0,01 ^{by}	1,60 ± 0,01 ^{az}	27,7 ± 0,01 ^b
3	--	3,0	19,31 ± 0,02 ^{cx}	7,86 ± 0,02 ^{ay}	0,61 ± 0,02 ^{cz}	27,8 ± 0,02 ^b
4	0,75	1,0	3,64 ± 0,01 ^{dx}	1,92 ± 0,01 ^{ey}	0,24 ± 0,01 ^{fz}	5,79 ± 0,01 ^d
5	0,75	2,0	2,02 ± 0,01 ^{fx}	1,78 ± 0,01 ^{fy}	0,42 ± 0,01 ^{dz}	4,22 ± 0,01 ^f
6	0,75	3,0	4,23 ± 0,02 ^{dx}	2,73 ± 0,02 ^{dy}	0,39 ± 0,02 ^{ez}	7,35 ± 0,02 ^c
7	1,5	1,0	3,11 ± 0,01 ^{ex}	2,02 ± 0,01 ^{ey}	0,40 ± 0,01 ^{dz}	5,53 ± 0,01 ^e
8	1,5	2,0	2,06 ± 0,02 ^{fx}	1,45 ± 0,02 ^{gy}	0,66 ± 0,02 ^{cz}	4,17 ± 0,02 ^f
9	1,5	3,0	4,24 ± 0,01 ^{dx}	2,73 ± 0,01 ^{dy}	0,42 ± 0,01 ^{dz}	7,39 ± 0,01 ^c
10 (controle)	0,75	--	1,70 ± 0,02 ^{gx}	1,17 ± 0,02 ^{hy}	0,00 ^{gz}	2,86 ± 0,02 ^g

¹ ANA = ácido naftaleno acético. ² Valores médios com uma mesma letra em uma coluna (a-h) e em uma linha (x-z) não apresentam diferença significativa (teste de Tukey, p > 0,05). C = curcumina, DMC = desmetoxicurcumina, BDMC = bisdesmetoxicurcumina.

Condições cromatográficas: CLAE com coluna Shim-Pack CLC-NH₂ (4,6 x 150 mm), fase móvel etanol:água (90:10), fluxo de 0,4 mL/min, UV visível, limite de detecção 425 nm.

A predominância da curcumina em relação ao teor total dos pigmentos curcuminóides nas raízes foi também observada para todas as concentrações de KCl adicionadas ao meio MS (Tabela III.15 e Figura III. 16) à semelhança do observado para as raízes formadas na presença de diferentes concentrações de KNO₃. A desmetoxicurcumina foi o segundo predominante, seguida pela bisdesmetoxicurcumina, cuja proporção em relação ao teor total foi inferior a 17%.

As maiores concentrações de pigmentos curcuminóides e de curcumina foram encontradas nas raízes formadas em meio MS sem a adição de KCl, e com 1,0 mg/L do regulador de crescimento ANA. Maiores concentrações de desmetoxicurcumina e de bisdesmetoxicurcumina também foram encontradas nas raízes produzidas em meio sem a adição de KCl, entretanto, em diferentes concentrações de ANA – 3,0 e 2,0 mg/L, respectivamente. Estes resultados sugerem que a incorporação de KCl no meio MS foi prejudicial à formação de pigmentos curcuminóides nas raízes de cúrcuma *in vitro*.

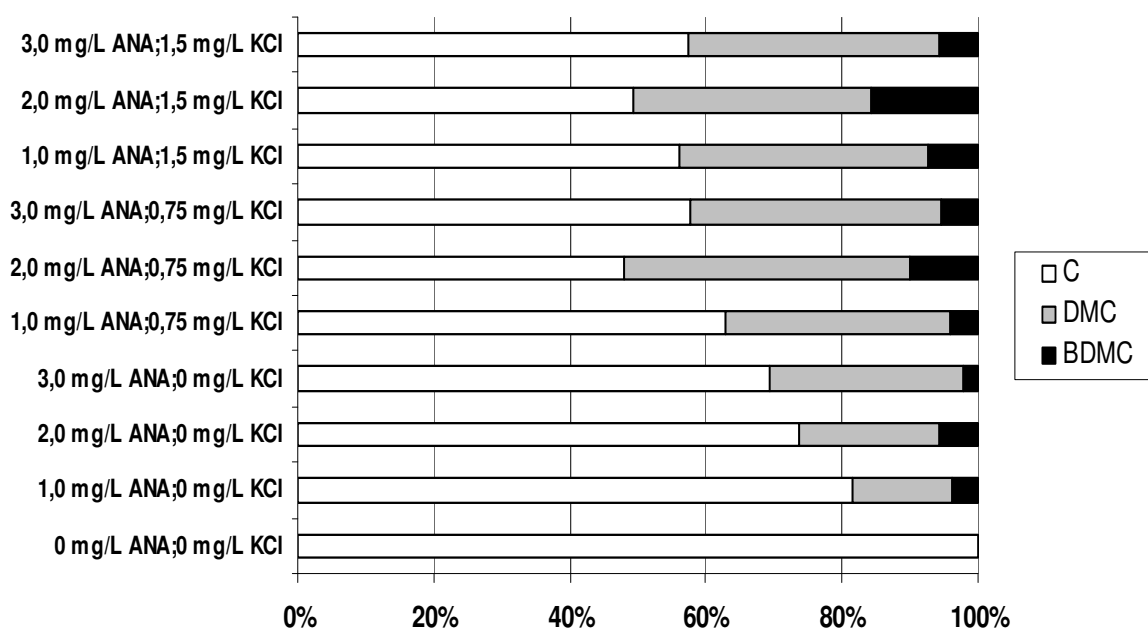


Figura III.16. Proporção de pigmentos curcuminóides encontrados em raízes de cúrcuma formadas *in vitro* na presença de diferentes concentrações de KCl em meio MS contendo três concentrações do regulador de crescimento ANA (C = curcumina; DMC = desmetoxicurcumina; BDMC = bisdesmetoxicurcumina).

3.5. INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DE SAIS DE POTÁSSIO EM MEIO MS, NA PRESENÇA DE TRÊS CONCENTRAÇÕES DE ANA NA FORMAÇÃO DE ÓLEOS ESSENCIAIS EM CALOS E RAÍZES

Conforme indicado na Figura III.7, são vários os compostos voláteis presentes no óleo essencial da cúrcuma em pó. Entretanto, para investigar a influência da concentração de sais de potássio e do regulador de crescimento ANA na produção destas substâncias, foram comparados os perfis cromatográficos e as áreas de alguns componentes relevantes como o limoneno, o borneol, a ar-turmerona e a área total. Para a avaliação da presença destes compostos nas amostras foram utilizados os padrões de limoneno (1); borneol (2) e ar-turmerona (3) este último, gentilmente cedido pela Prof^a Marília Martins da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais.

3.5.1. Influência da concentração de sais de potássio na formação de óleos essenciais em calos

Os perfis cromatográficos de óleos essenciais totais das amostras de calos obtidos em meio MS na presença de três diferentes concentrações do regulador de crescimento ANA no meio MS estão apresentados na Figura III.17.

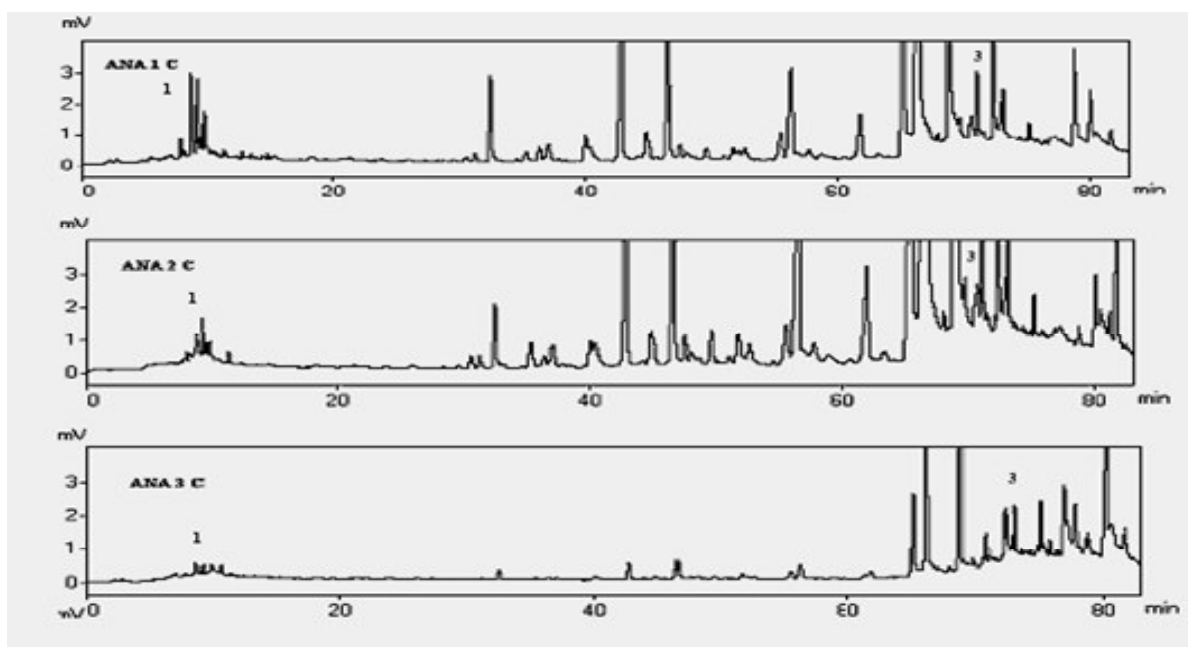


Figura III.17. Perfis cromatográficos de óleos essenciais de calos de cúrcuma obtidos em meio MS na presença de três concentrações (1,0; 2,0; e 3,0 mg/L) do regulador de crescimento ANA. Picos: (1) limonol e (3) ar-turmerona. Condições cromatográficas: SPME-CG-FID, coluna capilar DB-1 (25 m x 0,32 mm; 0,52 μ m), fibra de polidimetilsiloxano; gás de arraste = He, injeção *splitless*; adsorção 5 minutos a 80 °C; dessorção 15 minutos a 220 °C. Temperatura do injetor 220 °C, detector a 250 °C, programação da temperatura da coluna variou de 60 a 200 °C.

Verificou-se que quanto menor a concentração do regulador de crescimento utilizado, maior foi a intensidade dos picos observados. Entretanto, na ausência do regulador de crescimento ANA, não foi observada a formação de óleos essenciais (cromatograma não apresentado) sugerindo ser este regulador de crescimento importante na formação dos óleos essenciais. Os dados encontrados na literatura estão de acordo com o perfis para estes óleos.

Observou-se que o borneol, apesar de ter sido relatado na literatura como componente dos óleos essenciais da cúrcuma (OGUNTIMEIN et al., 1990; RICHARD & LOO, 1992; ZWAVING & BOS, 1992), não foi encontrado nas amostras de calos e raízes analisadas. MATA et al. (2004) também verificaram a ausência deste composto ao analisar amostras de cúrcuma em pó obtidas de rizomas produzidos no Brasil.

Os perfis cromatográficos dos óleos essenciais em calos produzidos em meio MS com regulador de crescimento ANA na concentração de 2,0 mg/L e com diferentes teores de KNO_3 estão apresentados na Figura III.18. Observou-se que ao utilizar 2,1 g/L de KNO_3 , houve maior formação de óleo essencial.

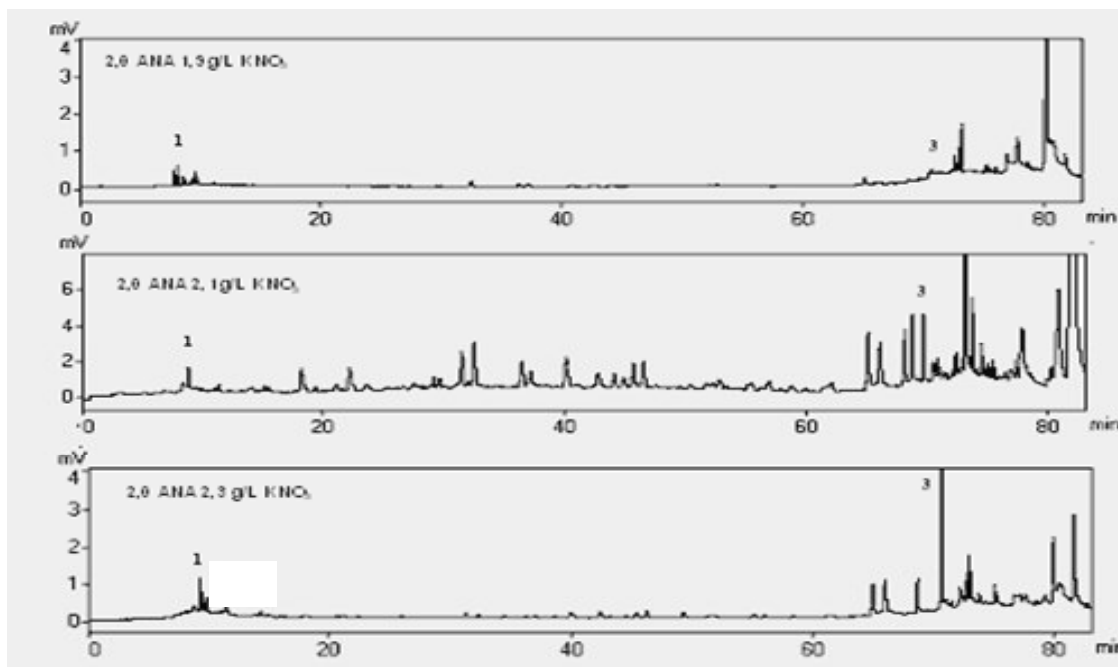


Figura III.18. Perfis cromatográficos de óleos essenciais de calos de cúrcuma obtidos em meio MS com diferentes concentrações de KNO_3 na presença do regulador de crescimento ANA na concentração de 2,0 mg/L. Picos: (1) limoneno e (3) ar-turmerona. Condições cromatográficas: SPME-CG-FID, coluna capilar DB-1 (25 m x 0,32 mm; 0,52 μ m), fibra de polidimetilsiloxano; gás de arraste = He, injeção *splitless*; adsorção 5 minutos a 80 °C; dessorção 15 minutos a 220 °C. Temperatura do injetor 220 °C, detector a 250 °C, programação da temperatura da coluna variou de 60 a 200 °C.

Os resultados obtidos ao comparar alguns picos relevantes no óleo essencial da cúrcuma estão apresentados na Tabela III.16. Em todas as concentrações de ANA utilizadas, um aumento na concentração de KNO₃ no meio MS causou um aumento nas áreas do limoneno, da ar-turmerona e na área total.

Os perfis cromatográficos dos óleos essenciais em calos produzidos em meio MS com diferentes teores de KCl e com o regulador de crescimento ANA na concentração de 2,0 mg/L estão apresentados na Figura III.19. Ao utilizar 0,75 mg/L de KCl, observou-se a presença de picos com intensidade moderada na região próxima aos 10 minutos de retenção, quando comparado às duas outras concentrações de KCl. Houve também uma alteração no perfil dos picos que eluíram após 60 minutos de corrida.

Tabela III.16. Influência da concentração de KNO₃ no perfil cromatográfico dos óleos essenciais de calos produzidos por cúrcuma *in vitro* em meio MS contendo três concentrações do regulador de crescimento ANA

Tratamentos	KNO ₃ (g/L)	ANA ¹ (mg/L)	Area ² (mV)		
			limoneno	ar-turmerona	total
1	1,9	1,0	124	1.505	360.368
2	1,9	2,0	227	2.145	252.738
3	1,9	3,0	234	2.169	355.434
4	2,1	1,0	408	15.845	1.029.254
5	2,1	2,0	629	20.007	1.099.062
6	2,1	3,0	523	19.613	1.109.123
7	2,3	1,0	1.142	63.483	1.128.876
8	2,3	2,0	1.230	63.485	1.161.237
9	2,3	3,0	1.304	78.525	1.171.144
10 (controle)	1,9	--	nd	nd	nd

¹ ANA = ácido naftaleno acético. ² Área dos picos.

Condições cromatográficas: SPME-CG-FID, coluna capilar DB-1 (25 m x 0,32 mm; 0,52 µm), fibra de polidimetilsiloxano; gás de arraste = He, injeção *splitless*; adsorção 5 minutos a 80 °C; dessorção 15 minutos a 220 °C. Temperatura do injetor 220 °C, detector a 250 °C, programação da temperatura da coluna variou de 60 a 200 °C.

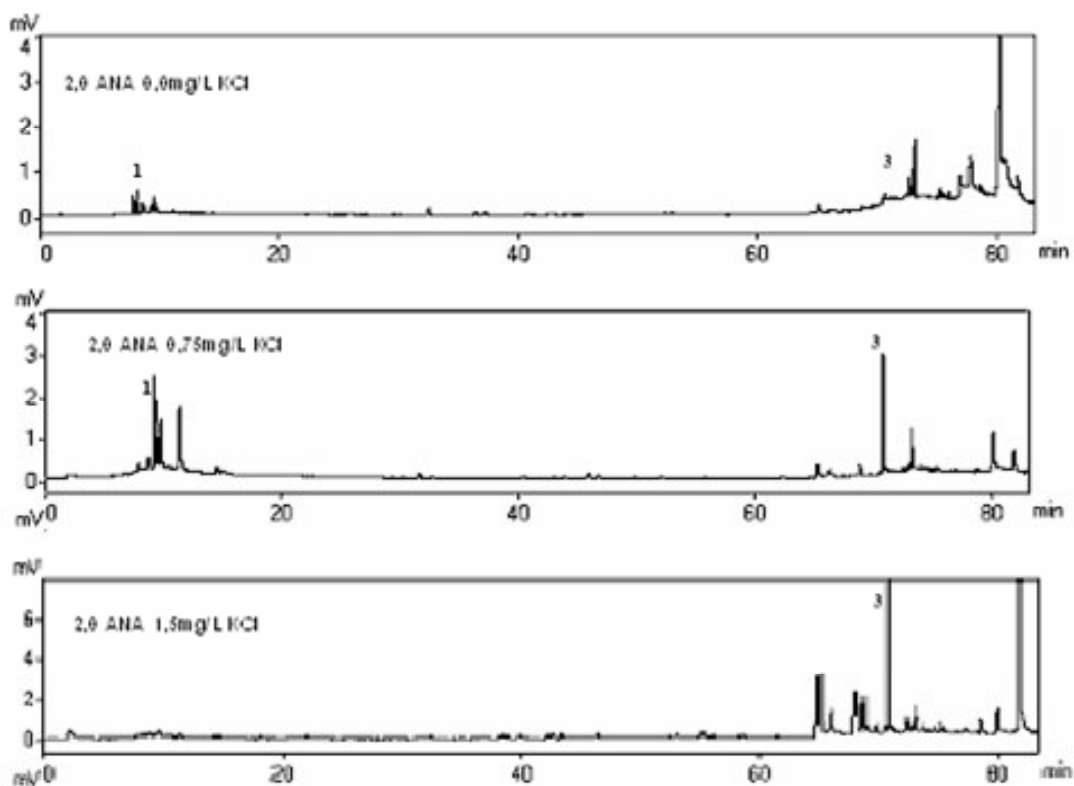


Figura III.19. Perfis cromatográficos de óleos essenciais dos calos de cúrcuma obtidos em meio MS na presença de diferentes concentrações de KCl e do regulador de crescimento ANA na concentração de 2,0 mg/L. Picos: (1) limoneno e (3) ar-turmerona. Condições cromatográficas: SPME-CG-FID, coluna capilar DB-1 (25 m x 0,32 mm; 0,52 μ m), fibra de polidimetilsiloxano; gás de arraste = He, injeção *splitless*; adsorção 5 minutos a 80 °C; dessorção 15 minutos a 220 °C. Temperatura do injetor 220 °C, detector a 250 °C, programação da temperatura da coluna variou de 60 a 200 °C.

Os resultados obtidos ao comparar a influência de diferentes concentrações de KCl em alguns picos relevantes no óleo essencial da cúrcuma estão apresentados na Tabela III. 17. Observou-se que em todas as concentrações de ANA utilizadas, a adição de 0,75 mg/L de KCl promoveu um aumento nas áreas dos picos de limoneno, da ar-turmerona e na área total, entretanto um aumento de 1,5 mg/L causou uma diminuição nas áreas destes compostos.

Tabela III.17. Influência da concentração de KCl no perfil cromatográfico dos óleos essenciais de calos produzidos de cúrcuma *in vitro* em meio MS contendo três concentrações do regulador de crescimento ANA

Tratamentos	KCl (mg/L)	ANA ¹ (mg/L)	Area ² (mV)		
			limoneno	ar-turmerona	Total
1	--	1,0	124	1.505	360.368
2	--	2,0	227	2.145	252.738
3	--	3,0	234	2.169	355.434
4	0,75	1,0	845	9.148	283.677
5	0,75	2,0	1.006	12.344	290.196
6	0,75	3,0	1.171	18.435	307.578
7	1,5	1,0	236	997	89.710
8	1,5	2,0	262	822	73.790
9	1,5	3,0	333	1001	93.570
10 (controle)	0,75	--	--	--	--

¹ ANA = ácido naftaleno acético. ² Área dos picos.

Condições cromatográficas: SPME-CG-FID, coluna capilar DB-1 (25 m x 0,32 mm; 0,52 µm), fibra de polidimetilsiloxano; gás de arraste = He, injeção *splitless*; adsorção 5 minutos a 80°C; dessorção 15 minutos a 220 °C. Temperatura do injetor 220 °C, detector a 250 °C, programação da temperatura da coluna variou de 60 a 200 °C.

Observa-se que um aumento na concentração de KNO₃, causou um aumento nas áreas dos componentes dos óleos essenciais, independente da concentração de ANA adicionado. Por outro lado, a adição do KCl, promoveu uma diminuição na área total dos picos obtidos por cromatografia gasosa. Entretanto, a adição de 0,75 mg/L de KCl promoveu um aumento nas áreas do limoneno e da ar-turmerona, seguida uma diminuição nas respectivas áreas, ao aumentar a concentração para 1,5 mg/L.

De um modo geral, a incorporação de KNO₃ ao meio MS foi a condição que proporcionou uma maior área de alguns componentes e área total, sugerindo ser esta a melhor condição para a produção de óleos essenciais em calo de cúrcuma *in vitro*.

3.5.2. Influência da concentração de sais de potássio na formação de óleos essenciais em raízes

Os perfis cromatográficos de amostras de raízes obtidas em meio MS, na presença de três diferentes concentrações do regulador de crescimento ANA no meio MS padrão estão apresentados na Figura III.20. Para a avaliação da presença destes compostos nas amostras foram utilizados os padrões de limoneno (1); borneol (2) e ar-turmerona (3), conforme relatado na avaliação dos calos.

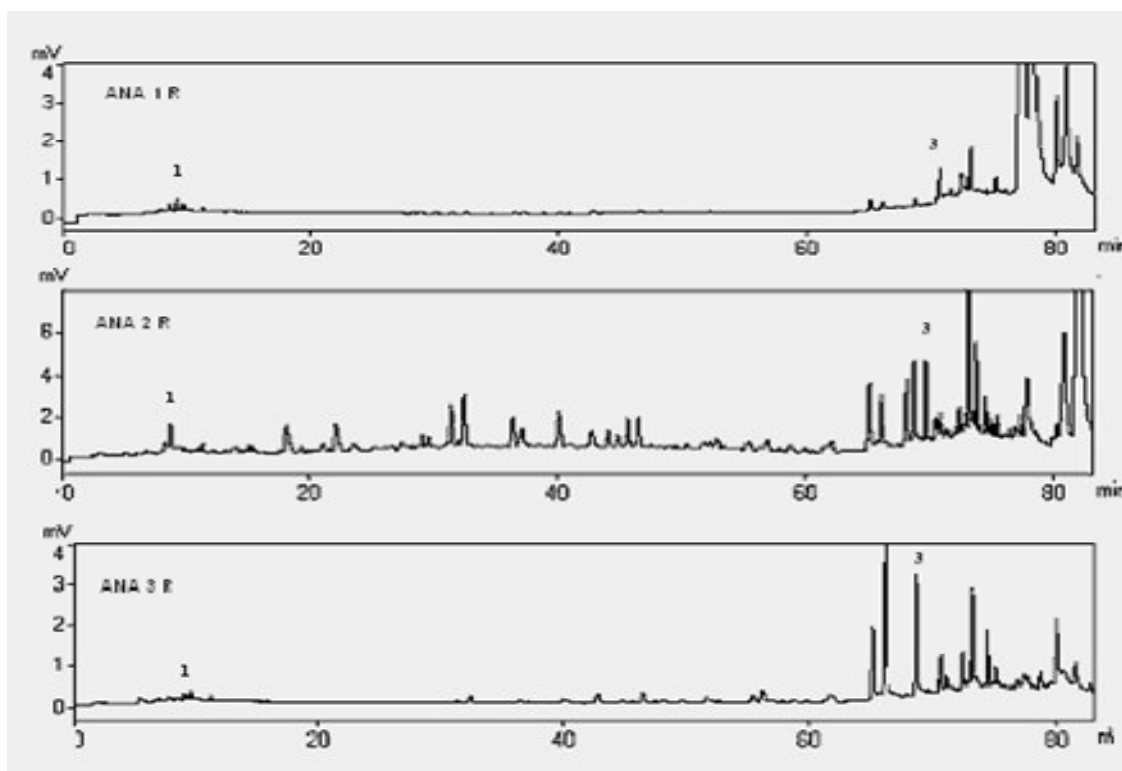


Figura III.20. Perfis cromatográficos de óleos essenciais de raízes de cúrcuma obtidas em meio MS na presença de três concentrações (1,0; 2,0; e 3,0 mg/L) do regulador de crescimento ANA. Picos: (1) limonenol e (3) ar-turmerona. Condições cromatográficas: SPME-CG-FID, coluna capilar DB-1 (25 m x 0,32 mm; 0,52 μ m), fibra de polidimetilsiloxano; gás de arraste = He, injeção *splitless*; adsorção 5 minutos a 80 °C; dessorção 15 minutos a 220 °C. Temperatura do injetor 220 °C, detector a 250 °C, programação da temperatura da coluna variou de 60 °C a 200 °C.

Os perfis cromatográficos dos óleos essenciais de raízes produzidas em meio MS com regulador de crescimento ANA na concentração de 2,0 mg/L e com diferentes teores de KNO₃ estão apresentados na Figura III.21. Observa-se que um maior número e uma

maior concentração de picos foram observados para as raízes produzidas no meio MS contendo 1,9 g/L de KNO_3 , que é a concentração normal deste sal no meio MS.

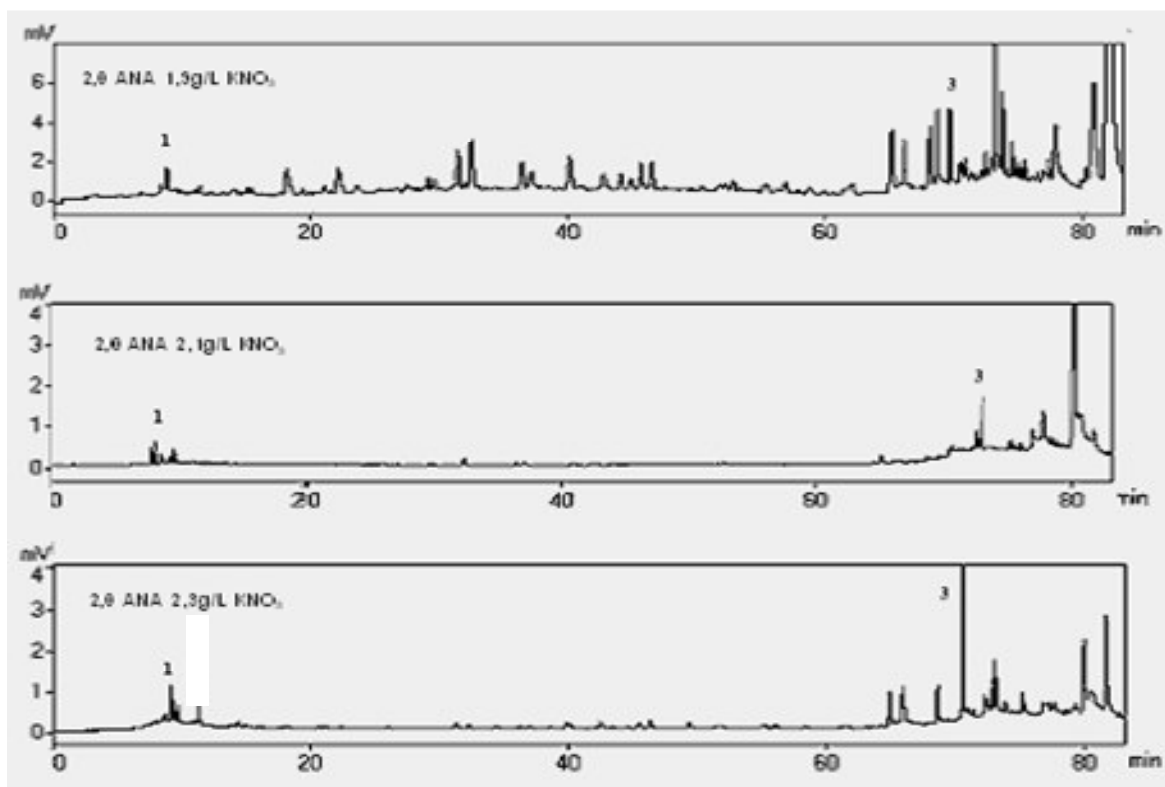


Figura III. 21. Perfis cromatográficos de óleos essenciais de raízes de cúrcuma obtidos em meio MS com diferentes concentrações de KNO_3 e do regulador de crescimento ANA na concentração de 2,0 mg/L. Picos: (1) limoneno e (3) ar-turmerona. Condições cromatográficas: SPME-CG-FID, coluna capilar DB-1 (25 m x 0,32 mm; 0,52 μm), fibra de polidimetilsiloxano; gás de arraste = He, injeção *splitless*; adsorção 5 minutos a 80 °C; dessorção 15 minutos a 220 °C. Temperatura do injetor 220 °C, detector a 250 °C, programação da temperatura da coluna variou de 60 a 200 °C.

Os resultados obtidos ao comparar alguns picos relevantes no óleo essencial da raiz estão apresentados na Tabela III.18

Observou-se que um aumento na concentração de KNO_3 causou uma diminuição nas áreas de alguns componentes e na área total dos picos dos óleos essenciais obtidos da raiz.

Tabela III.18. Influência da concentração de KNO₃ no perfil cromatográfico dos óleos essenciais em raízes produzidas por cúrcuma *in vitro* em meio MS contendo três concentrações do regulador de crescimento ANA

Tratamentos	KNO ₃ (g/L)	ANA ¹		Area ² (mV)	
		(mg/L)	limoneno	ar-turmerona	total
1	1,9	1,0	1.000	8.988	114.312
2	1,9	2,0	929	9.351	115.746
3	1,9	3,0	982	9.107	110.103
4	2,1	1,0	293	7.819	111.670
5	2,1	2,0	255	7.778	118.049
6	2,1	3,0	272	6.190	113.291
7	2,3	1,0	693	7.819	112.410
8	2,3	2,0	762	7.628	100.829
9	2,3	3,0	787	6.312	97.150
10 (controle)	1,9	--	--	--	--

¹ ANA = ácido naftaleno acético. ² Area dos picos.

Condições cromatográficas: SPME-CG-FID, coluna capilar DB-1 (25 m x 0,32 mm; 0,52 µm), fibra de polidimetilsiloxano; gás de arraste = He, injeção *splitless*,; adsorção 5 minutos a 80°C; dessorção 15 minutos a 220 °C. Temperatura do injetor 220 °C, detector a 250 °C, programação da temperatura da coluna variou de 60 °C a 200 °C.

Os perfis cromatográficos dos óleos essenciais em raízes produzidas em meio MS com diferentes teores de KCl e com regulador de crescimento ANA na concentração de 2,0 mg/L estão apresentados na Figura III.22.

Observa-se que a raiz produzida em meio MS na ausência de KCl foi a que apresentou um maior número e uma maior intensidade de picos. Ao se adicionar 0,75 mg/L de KCl, houve uma diminuição no número e essa área dos picos e na concentração de 1,5 mg/L, houve maior formação de picos com baixo tempo de retenção (~10 minutos), em detrimento daqueles de maior tempo de retenção (~70 minutos).

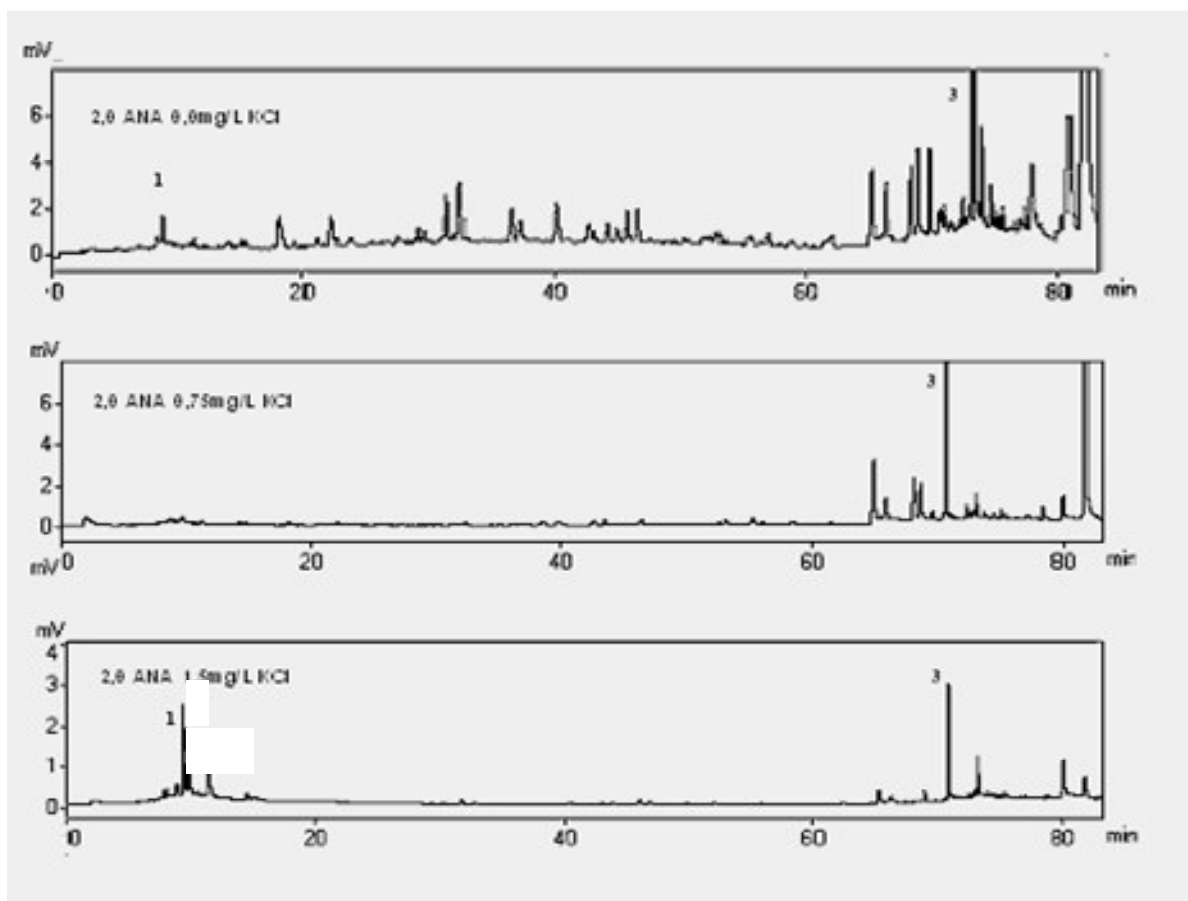


Figura III.22. Perfis cromatográficos de óleos essenciais de raízes de cúrcuma obtidos em meio MS com diferentes concentrações de KCl, na presença do regulador de crescimento ANA na concentração de 2,0 mg/L. Picos: (1) limoneno e (3) ar-turmerona. Condições cromatográficas: SPME-CG-FID, coluna capilar DB-1 (25 m x 0,32 mm; 0,52 μ m), fibra de polidimetilsiloxano; gás de arraste = He, injeção *splitless*; adsorção 5 minutos a 80 °C; dessorção 15 minutos a 220 °C. Temperatura do injetor 220 °C, detector a 250 °C, programação da temperatura da coluna variou de 60 a 200 °C.

As raízes obtidas após o cultivo de explante na presença de diferentes concentrações de KCl em meio MS contendo três concentrações do regulador de crescimento ANA estão apresentadas na tabela III.19. Observou-se que a adição de KCl promoveu um aumento na área de alguns picos e na área total dos óleos essenciais.

Tabela III.19. Influência da concentração de KCl no perfil cromatográfico dos óleos essenciais de raízes produzidas em meio MS contendo três concentrações do regulador de crescimento ANA

Tratamentos	KCl (mg/L)	ANA ¹ (mg/L)	Area ² (mV)		
			limoneno	ar-turmerona	total
1	--	1,0	1.000	8.988	114.312
2	--	2,0	929	9.351	115.746
3	--	3,0	982	9.107	110.103
4	0,75	1,0	942	13.983	136.856
5	0,75	2,0	944	14.786	127.848
6	0,75	3,0	1.076	14.882	145.120
7	1,5	1,0	1.093	20.324	141.782
8	1,5	2,0	1.137	26.532	161.237
9	1,5	3,0	1.353	27.580	171.144
10 (controle)	0,75	--	--	--	--

¹ ANA = ácido naftaleno acético. ² Area dos picos.

Condições cromatográficas: SPME-CG-FID, coluna capilar DB-1 (25 m x 0,32 mm; 0,52 µm), fibra de polidimetilsiloxano; gás de arraste = He, injeção *splitless*; adsorção 5 minutos a 80°C; dessorção 15 minutos a 220 °C. Temperatura do injetor 220 °C, detector a 250 °C, programação da temperatura da coluna variou de 60 a 200 °C.

Observa-se que um aumento na concentração de KNO₃, não favoreceu a formação de óleos essenciais em raízes de cúrcuma. A adição do KCl, entretanto, promoveu um aumento na área total e dos picos de limoneno e ar-turmerona obtidos por cromatografia gasosa.

De um modo geral, a incorporação de KCl ao meio MS foi a condição que proporcionou uma maior área de alguns componentes e área total, sugerindo ser este sal o ideal comparado ao KNO₃ para a produção de óleos essenciais em raízes de cúrcuma *in vitro*.

4. CONCLUSÕES

O meio MS apresentou melhores resultados que o B5 para o estabelecimento de gemas da cúrcuma *in vitro*. Neste meio o uso da citocinina benzilaminopurina (BAP), possibilitou uma maior brotação de cúrcuma *in vitro*, sendo a concentração de 3,0 mg/L a que forneceu o meio de brotos/explante. O desenvolvimento das plântulas obtidas *in vitro*, nestas condições, e cultivadas em solo geraram rizomas sadíos. Nas análises físico-químicas foram observados um maior rendimento de cúrcuma em pó e com teores elevados de pigmentos curcuminóides, óleos essenciais, proteínas e lipídeos em relação aos resultados citados na literatura.

Diferentes reguladores de crescimento e concentrações foram observadas comparativamente em meio MS, sendo que o ANA de 2,0 e 3,0 mg/L, foi o mais eficiente na a obtenção de calos e raízes respectivamente. Adicionando os sais de potássio (KNO_3 e KCl), meio MS e concentrações de ANA foi possível avaliar a influência destes, na formação de calos e raízes.

A concentração de 2,1 g/L de KNO_3 foi independente da concentração de ANA, na dosagem de 2,3 g/L 3, com 1,0 mg/L de ANA favoreceram a formação de calos de cúrcuma *in vitro*. Foi observado, nestas condições, que a formação de calos foi reduzida significativamente com a concentração de ANA acima de 1,0 mg/L. O aumento da concentração de ANA inibiu a produção de calos possivelmente porém o desenvolvimento de brotos foi observado. A influência do KCl na formação de calos foi maior significativamente quando a concentração foi de 0,75 g/L de KCl em ANA 1,0 mg/L. O aumento progressivo de KCl e ANA reduziram a obtenção de calos, ressaltando ainda que a utilização do meio MS e ANA foram suficientes para a produção de calos, sendo então questionada a necessidade de utilização de KCl no meio para este fim.

Na formação de raízes o aumento das concentrações de KNO_3 não diferenciou significativamente o desenvolvimento de raízes de cúrcuma *in vitro*, exceto na concentração de 1,9 g/L de KNO_3 em meio MS com 3, mg/L de ANA. A observação destes resultados possibilita o estudo de concentrações menores deste sal.

A presença de KCl favoreceu o desenvolvimento de raízes de cúrcuma *in vitro*, as concentrações de 0,75 e 1,5 g/L não apresentaram diferenças, sendo então indicada a utilização da menor concentração de este sal.

Nas análises realizadas com os tratamentos propostos a produção de pigmentos em calos e raízes, mostrou que a concentração de 2,1 g/L de KNO_3 e do regulador de crescimento 3,0 mg/L de ANA afetaram de forma significativa a predominância e os teores

de pigmentos curcuminóides em calos de cúrcuma produzidos *in vitro*. Nos tratamentos com KCL observou-se que na ausência deste os melhores resultados foram obtidos, sendo diferenciados apenas pela concentração de ANA. A presença de KCl afetou de forma negativa a produção de pigmentos curcuminóides em calos e raízes de cúrcuma produzidas *in vitro*.

Nas análises realizadas para verificar a concentração de óleos essenciais observou-se que o aumento na concentração de regulador de crescimento ANA causou um aumento nas áreas dos picos CG - FID dos óleos essenciais dos calos de cúrcuma produzidas *in vitro*. Os valores mais elevados foram obtidos quando utilizada a concentração de 2,3 g/L de KNO_3 e 3,0 mg/L de ANA. Nos meios em que o houve a adição de de KCl foi observado uma redução nas áreas dos picos CG - FID na concentração de 1,5 mg/L, a produção de óleos essenciais totais, enquanto que na ausência deste e nas concentrações de 0,75 g/L as áreas foram semelhantes. A adição de KNO_3 foi favorável à produção de óleos essenciais de foema geral sendo que a maiores concentrações de ar-turmerona se deram na concentração de 1,9 g/L de KNO_3 . Um aumento na concentração de KNO_3 causou uma diminuição nos tipos e áreas dos picos cromatográficos.

A presença de KCl no meio MS contendo diferentes concentrações de ANA, favoreceu o número e área dos picos de óleos essenciais de raízes de cúrcuma obtidos *in vitro*.

CONCLUSÕES INTEGRADAS

A cromatografia em camada delgada permitiu a identificação dos pigmentos curcuminóides e foi utilizada também para verificar o grau de pureza, qualitativamente, dos pigmentos isolados durante o processo de separação e a cristalização da curcumina foi utilizada para a purificação deste pigmento e também diminuir sua interferência nos demais pigmentos.

A estrutura dos pigmentos curcuminóides foi confirmada através de técnicas usuais (IV, UV, RMN de ^1H e de ^{13}C). A pureza foi verificada através do ponto de fusão e pela cromatografia líquida de alta eficiência. A coloração dos pigmentos foi caracterizada pelo sistema CIE. Estes dados permitiram o estudo da atividade biológica em cada pigmento separadamente, e podem ser utilizados para futuras pesquisas.

Avaliando a atividade biológica verificou-se que a ação antimicrobiana não foi inibida contra o crescimento de *S. aureus*, *B. subtilis*, *S. choleraesuis*, *E. coli*, *A. niger*, *S. cerevisiae*, e *C. albicans*, quando utilizados os extratos de cúrcuma em pó, cúrcuma comercial e ainda com curcumina e a desmetoxicurcumina.

A bisdesmetoxicurcumina isolada apresentou atividade antimicrobiana *in vitro* em relação ao *Bacillus subtilis*, sendo necessária uma concentração superior dez vezes àquela utilizada quando comparada ao antibiótico cloranfenicol.

A atividade antimicrobiana do óleo essencial obtido por hidrodestilação em aparelho de Clevenger foi efetiva para o *B. subtilis*, *S. choleraesuis*, *E. coli*, *A. niger* e *S. cerevisiae*. A inibição aumentou com o aumento da dose e foi maior do que aquela obtida com os respectivos antibióticos.

Os resultados obtidos sugerem ser a bisdesmetoxicurcumina e o óleo essencial da cúrcuma possíveis agentes antimicrobianos para uso na indústria alimentícia e farmacêutica. O sinergismo entre os pigmentos e os óleos essenciais não foram observados neste estudo.

Para o estabelecimento da cultura de células *in vitro* o meio Murashige –Skoog apresentou melhores resultados que o B5 (Gamborg) e a presença da concentração de 3,0 mg/L a que forneceu os melhores resultados na produção de plântulas. A ANA e CIN utilizadas com o BAP não contribuíram para melhores resultados.

As plântulas obtidas *in vitro* e cultivadas em solo proporcionaram o desenvolvimento de rizomas com um maior rendimento de cúrcuma em pó e com teores

elevados de pigmentos curcuminóides, óleos essenciais, proteínas e lipídeos em relação a outros resultados produzidos com rizomas analisados.

ANA, nas concentrações de 2,0 e 3,0 mg/L, foi o regulador de crescimento ideal para a indução de calos e raízes, respectivamente, sendo indispensável para o desenvolvimento.

O desenvolvimento dos calos em meio MS e regulador de crescimento ANA, foi favorecido com o aumento da concentração para 2,1 g/L de KNO_3 . Quando este meio e regulador foi utilizado com KCl o crescimento dependeu da concentração do regulador de crescimento ANA.

Na produção de raízes o KCl propiciou o melhor desenvolvimento, no entanto KNO_3 não favoreceu ao aumento desta produção. As equações polinomiais de segunda ordem descreveram a influencia dos sais de potássio e na produção de pigmentos curcuminóides e de óleos essenciais em calos e raízes.

A produção de pigmentos curcuminóides e de óleos essenciais foi otimizada com as alterações na concentração dos sais de potássio, quando comparada ao grupo sem regulador de crescimento e sem os sais de potássio. O meio MS com 2,1 g/L de KNO_3 e de ANA 3,0 mg/L foi a condição ideal para a produção de pigmentos em raízes de cúrcuma. Verificou-se a predominância da curcumina, como o pigmento de maior concentração nas raízes de cúrcuma produzidas *in vitro*, independente da concentração de ANA e do tipo e concentração dos sais de potássio. Quanto à produção em calos, a concentração de 2,1 g/L de KNO_3 e 1,0 mg/L de ANA no meio afetou os pigmentos curcuminóides.

Um aumento na concentração de regulador de crescimento ANA causou uma diminuição nas áreas dos picos CG - FID dos óleos essenciais dos calos de cúrcuma produzidas *in vitro*, porém a adição de 0,75 mg/L de KCl em todas as concentrações de ANA, promoveu um aumento nas áreas dos picos CG - FID

Nas raízes, utilizando 1,9 g/L de KNO_3 , um maior número e área de picos CG - FID foram obtidos. O aumento na concentração de KNO_3 causou uma diminuição nos tipos e áreas dos picos cromatográficos. O aumento na concentração de KCl em meio MS contendo diferentes concentrações de ANA, favoreceu o número e área dos picos de óleos essenciais de raízes de cúrcuma obtidos *in vitro*.

Finalmente os resultados obtidos na identificação e caracterização dos pigmentos contribuem para serem utilizados na identificação de curcuminóides, permitindo avaliar as propriedades biológicas de cada pigmento isoladamente. A atividade antimicrobiana foi observada para utilização dos extratos de bisdemetoxicurcumina e a ação dos mono e

sesquiterpenos presentes nos óleos essenciais. Pela primeira vez é descrito o cultivo da cúrcuma *in vitro* realizadas alterações na concentração de sais de potássio e verificada sua influência no desenvolvimento de calo e raiz e na produção de metabólitos secundários.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHSAN, H.; PARVEEN, N.; KHAN, N. U.; HADI, S. M. Pro-oxidant, antioxidant and cleavage activities on DNA of curcumin and its derivatives demethoxycurcumin and bisdemethoxycurcumin. *Chemo- Biological Interactions*, v.121, p. 161-175, 1999.
- ALONSO, J.R. Tratado de fitomedicina – Bases clínicas e farmacológicas. ISIS, Buenos Aires, 1998, p. 439 – 445.
- AMARAL, C.E.C. Quantificação por CLAE e características de cor CIE L* a* b* de pigmentos curcuminóides. Curso de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, Faculdade de Farmácia, UFMG (Dissertação de mestrado), 71 p., 2000.
- AMMON, H.P.T.; WAHL, M.A. Pharmacology of *Curcuma longa*. *Planta Medica*, v.57, p.1-7, 1991.
- ANAND, P.H.M.; MOLLY, H.; HARIHARAN, M.; KISBOR, P.B.K. *In vitro* plant regeneration from rhizome bud-derived callus in yellow-zerdoary (*Curcuma aromatica*) – a medical plant. Plant tissue culture and biotechnology emerging trends. *Proceedings of a symposium held at Hyderabad, India*, v. 29, p. 187 – 192, 1999.
- AOAC (Association Official Analytical Chemistry). *Official methods of analysis of AOAC International*. Arlington . 16. ed. AOAC International, 1995. Cap. 43, p. 3.
- APISARIYAKUL, A.; VANITANAKON, N.; BUDDHASUKT, A. Antifungal activity of turmeric extract from *Curcuma longa* (Zingiberaceae). *Journal Ethnopharmacology*, v. 15, n.49, p. 163-169, 1995.
- ASAI, A.; NAKAGAWA. K.; MIYAZAWA, T. Antioxidative effects of turmeric, rosemary and capsicum extracts on membrane phospholipid peroxidation and liver lipid metabolism in mice. *Bioscience Biotechnology Biochemistry*, v. 63, n. 12, p. 2118 - 2122, 1999.
- ASTA Method. *Official Analytical Methods of the American Spice Trade Association*, 3rd ed.: American Spice Trade Association; Englewood Cliffs, NJ.,1985.
- BALANCHANDRAN, S.M.; BHAT, S.; CHANDEL K.P.S. *In vitro* clonal multiplication of turmeric (*Curcuma spp.*) and ginger (*Zingiber officinale* Rosc.). *Plant Report Cell*, v. 8, p. 521 – 524, 1998.
- BAMBIRRA, M.L.A.; JUNQUEIRA, R.G.; GLORIA, M.B.A Influence of post harvest processing conditions on yeild and quality of ground turmeric (*Curcuma longa* L.) *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v. 45, n. 4, p.423-429, 2002.

- BHAVANISHANKAR, T.N.; MURTHY S.V. Effect of turmeric fractions on the growth of some intestinal and pathogenic bacteria in vitro. *Indian Journal of Experimental Biology*, v. 17, p. 1363-1366, 1979.
- BONG, P.H. Spectral and photophysical behaviors of curcumin and curcuminoids. *Bulletin Korean Chemical Society*, v. 21, p. 81-86, 2000.
- BRUL, S.; COOTE, P. Preservative agents in foods: Mode of action and microbial resistance mechanisms. *International Journal of Food Microbiology*, v.50, p. 1-17, 1999).
- CECÍLIO FILHO, A.B. Época e densidade de plantio sobre a fenologia e rendimento da cúrcuma (*Curcuma longa*), Lavras, MG, 100p. Tese (Doutorado em Fitoctecnia), Universidade Federal de Lavras, 1996.
- CECÍLIO FILHO A.B.; SOUZA, R.J.; BRAZ, L.T.; TAVARES, M. Cúrcuma: planta medicinal, condimentar e de outros usos potenciais. *Ciência Rural*, v. 30, n. 1, p 171-175, 2000.
- CORREA, M.P. Dicionário de plantas úteis no Brasil. Açafroeira Rio de Janeiro: *Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal*, v. 1, p. 21-22, 1975.
- COWAN, M.M. Plants products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*. v.12, n. 4, p. 564 – 582, 1999.
- DAHL, T.A.; MCGOWAN W.M.; SHAND M.A.; SRINIVASAN, V.S. Photokilling of bacteria by natural dye, curcumin. *Archives Microbiology*, v.151, n. 2, p.183-185, 1989.
- DANTAS BARROS, A.M.; FOULQUIER, M.; COSSON, L.; JACQUIN-DUBREUIL, A. Cardenolide formation in cell suspension cultures of *Thevetia peruviana* (Pers.) K. Schum. *Phytochemistry*, v. 31, p. 2019-2020, 1993.
- DONALISIO, M.G. Instruções para o cultivo de cúrcuma. *Agrônomo* v. 32, p.171-175, 1980.
- DUKE, J.A. The green pharmacy, Emmaus: Rodale, 1997, 507 p.
- GAMBORG, O.L.; MILLER, R.A.; OJIMA, K. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Experimental Cell Research*, v.50, p.151-158, 1968.
- GAVIN, J.J. Microbiological process report analytical microbiology II. The diffusion methods. *Applied Microbiology*, v. 5, p. 25-33, 1957.
- GOLDWYN, L. Real spice of live [on line]. Disponível na Internet, via [WWW.URL.http://www.urf.org/shop/dec-report97.html](http://www.urf.org/shop/dec-report97.html). Dezembro/1997. (Arquivo capturado em 24 de fevereiro de 1999).

- GOTO, R. Épocas de plantio, adubação fosfatada e unidades térmicas em cultura de açafrão (*Curcuma longa* L.). Jaboticabal: Universidade Estadual de São Paulo, 1993, 93 p. (Doutorado em Agronomia – Produção Vegetal).
- GOVINDARAJAN, V.S. Turmeric – chemistry, technology and quality. *CRC – Critical Review in Food Science and Nutrition*, v.12, n.3, 1980, p. 199 – 301.
- GUL, N.; MUJAHID T.Y.; JEHAN, N.; AHMAD, S. Studies on the antibacterial effect of the different fractions of *Curcuma longa* against tract infections isolated, *Pakistan Journal of Biological Sciences*, n. 7, v. 12, p. 2055-2060, 2004
- HERTWIG, I.F. VON. Plantas aromáticas e medicina; São Paulo: Icone. 1986, p. 254-265.
- HESS, D. Plant physiology. New York: Springer-Verlag, 1975, p. 99-116.
- HUBER D. M.; ARNY, D.C. Interactions of potassium with plant disease. In Muunson. R.D Ed. *Potassium in Agriculture*, Madison: ASA, CSSA and SSA.1985, 467 p.
- JANAKI, N.; BOSE, J.L. An improved method for isolation of curcumin from turmeric (*Curcuma longa* L.). *Journal of the Indian Chemical Society*, v. 44, n. 11, p. 985-986, 1967.
- JANBEN, A.; GOLE, T.H. Thin layer chromatographic determination of curcumin from turmeric. *Journal of the Indian Chemical Society*, v.44, p.985-986, 1984.
- JAYAPRAKASHA, G.K.; JAGAN, L.; RAO L.J.M.; SAKARIAH, K.S Chemistry and biological activities of *Curcuma longa*. *Journal Food Science of Technology*, v. 20, p. 1-16, 2005
- JAYAPRAKASHA, G.K.; RAO L.J.M.; SAKARIAH, K.S. Improved HPLC method for the determination of curcumin, demethoxycurcumin and bisdemethoxycurcumin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. v. 50, p. 3668-3672, 2002.
- JITOE, A.; MASUDA, T.; TENGAH, I.G.P.; SUPRAPTA, D.N.; GARA, I.W.; NAKATANI, N. Antioxidant activity of tropical ginger extracts and analysis of the contained curcuminóides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 40, p. 1337-1340, 1992.
- KIM, D.S.H.L.; PARK, S.Y.; KIM, J.Y. Curcuminoids from *Curcuma longa* L. (Zingiberaceae) that protect PC 12 rat pheochromocytoma and normal human umbilical vein endothelialcells from β A(1-42) insult. *Neuroscience Letters*, v. 303, p. 57-61, 2001.
- KRISHNAMURTHY, N.; MATHEW, A.G.; NAMBUDIRI, E.S.; SHIVASHANKAR, Y.S. LEWIS, Y.C.; NATARAJAN, C.P. Oil and oleoresin of turmeric. *Food Technology. Research Institute*, v. 18 (1), p. 37 – 45, 1976.

- LACHANCE, P.A.; GUHR, G. Role of phytochemicals in chronic disease prevention. In: LACHANCE, P.A. Nutraceutical: designer foods III: garlic, soy and licorice. Trumbull: *Food & Nutrition*, p. 323-328, 1997.
- LAVEE, M.; HOFFMAN, S. The effect of potassium ions on peroxidase activity and its isozyme composition as related to apple callus growth *In vitro*. *Botanical Gazette*, v. 132, (3) , 1971.
- LEE, H.; CHOI, K.; CHO, K.; AHN, Y. Fungicidal activity of ar-turmerone identified in *Curcuma longa* rhizome against six phytopathogenic fungi. *Agricultural Chemistry Biotechnology*, v. 46(1), p. 23-28, 2003.
- LEUNG, A Y.; FOSTER, S. Encyclopedia of common natural ingredients used in food, drugs and cosmetic 2nd ed, 1996, p.
- LOPES, L.C.; BARBOSA, J.G. Propagação de plantas ornamentais. Viçosa-MG. Apostila, UFV, 1988, 30 p.
- LUTOMSKI, J.; KEDZIA, B.; DEBSKA, W. Effect of on alcohol extract and of active ingredients from *Curcuma longa* on bacteria and fungi. *Planta Medica*, v. 26, n.1: 9 - 19, 1974.
- MAIA, N.B. A cúrcuma como corante. In: Seminário de Corantes Naturais, Campinas. S.P., 1991, 65 p.
- MALAVOLTA, E.; VITTI, G.C.; OLIVEIRA, S.A. Avaliação nutricional das plantas: princípios e aplicações. 2^o Ed. Piracicaba. *Associação Brasileira para a Pesquisa de Potassa e fosfato*, 1997, 319 p.
- MANGALAKUMARI, C.K.; MATHEES, A.G. Localization of significant constituents of turmeric. *Journal of Food Science and Technology*, v. 23, p. 93 – 96, 1986.
- MARTINS, M.C.; RUSIG, O. Cúrcuma – um corante natural. *Boletim da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Alimentos*, v.26, p. 53-65, 1992.
- MASUDA, T.; HIDAHA, K. ; SHINOHARA, A.; MAEKAWA, T.; TAKEDA, Y.; YAMAGUCHI, H. Chemical studies on antioxidant mechanism of curcuminoid: analysis of radical reaction products from curcumin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.47, p. 71-77, 1999.
- MATA, A.R.; NELSON, D.L.; AFONSO, R.J.C.F.; GLÓRIA, M.B.A; JUNQUEIRA, R.G. Identificação de compostos voláteis da cúrcuma empregando microextração por fase sólida e cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. , v.24, n.1, p.151 - 157, 2004.

- MATHAI, C.K. Variability in turmeric *Curcuma* spices germplasm for essential oil and curcumin. *Qualitas Plantarum Foods Human Nutrition*, v. 28, p. 219 – 225, 1976.
- MELLO, M.O.; AMARAL, A.F.C.; MELO, M. Quantificação da micropropagação de *Curcuma zerdoária* Roscoe. *Scientia Agricola*, v. 57, n. 4, p. 703-707, 2000.
- MESA, M.D.; RAMIREZ-TORTOSA, M.C.; AGUILERA, C.M.; RAMIREZ-BOSCA, A; GIL, A. Efectos farmacológicos e nutricionales de los extractos de *Curcuma longa* L. y de los curcuminoides. *Ars Pharmaceutica*, v. 41, n.3, p. 307-321, 2000.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, v. 15, p. 473-497, 1962.
- NADGAUDA, R.S.; MASCARENHAS, A.F. A method for screening high curcumin-containing turmeric (*Curcuma longa* L.) cultivars *in vitro*. *Plant Physiology*, v. 124, p. 359 – 364 , 1986.
- NADGAUDA, R.S.; MASCARENHAS, A.F.; HENDRE, R.R.; JAGANNATHAN, V. Rapid multiplication of turmeric (*Curcuma longa* L) plants by tissue culture. *Indian Journal of Experimental Biology*, v. 16, p. 120 – 122, 1978.
- NAGABHUSHAN, M.; NAIR, U.J.; AMONKAR, A.J.; D'SOZA, A.V.; BHIDE, S.H. Curcumins as inhibitors of nitrosation *in vitro*. *Indian Mutation Research*, v. 202, n. 1, p.163-169, 1988.
- NARAYANASWAMY, S. Regeneration of plants from tissue culture, in *Applied and Fundamental Aspects of Plant Cell, Tissue, and Organ Culture* Ed. Reinert & Bajaj, p.179-197, 1988.
- NAYAK, S.; NAIK, P.K. Factors Effecting *In Vitro* Microrhizome Formation and Growth in *Curcuma longa* L. and Improved Field Performance of Micropropagated Plants. *Science Asia*, v.32 p. 31 -37, 2006.
- NEGI, P.S.; CHAUHAN, A.S.; SADIA, G.A.; ROHINISHREE, Y.S.; RAMTEKE, R.S. Antioxidant and antibacterial activities of various seabuckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) seed extracts. *Food Chemistry* , v.12, p. 1180 1187, 2004.
- NUNAN, E.A; CAMPOS, L.M.M.; PAIVA, R.L.R.; OLIVEIRA S.T.; DADOUN, H.A.; OLIVEIRA, A.B. Estudo da atividade antimicrobiana de extrato de folhas *Aristolochia gigantea* Mart, e Zucc. *Revista de Farmácia e Bioquímica*, Belo Horizonte, v. 6, p. 33 -40,1985.
- OGUNTMEIN, B.O.; WEYERSTAHL, P.; MARSCHALL-WEYERSTAHL, H. Essential oil of *Curcuma longa* L. leaves. *Flavour and Fragrance Journal*, v. 5, p. 89-90, 1990.
- OHSHIRO, M.; KUROYANAGI, M.; UENO, A. Structures of sesquiterpenes from *Curcuma longa*. *Phytochemistry*, v. 29, n. 7, p. 2201-2205, 1990.

- OLIVEIRA, V.P.; GHIRALDINI, J.E.; SACRAMENTO, C.K. O cultivo de plantas produtoras de corantes. *Revista Brasileira de Corantes Naturais*, v.1, n.1, p. 232- 237, 1992.
- ORIHARA, Y.; FURUYA, T. Biotransformation of (-) borneol by cultured cells of *Eucalyptus perriniana*. *Phytochemistry*, v. 34, p. 1045-1048, 1993.
- OSAWA, T.; SUGIYAMA, Y.; INAYOSHI, M.; KAWAKISHI, S. Antioxidative activity of tetrahydrocurcuminóides. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, v. 59. n. 9, p. 1609-1612, 1995.
- PÉRET-ALMEIDA L. A influência da radiação gama na inibição do brotamento do rizoma e na qualidade da cúrcuma em pó. Belo horizonte: Faculdade de Farmácia da UFMG, 2000, 60 p. (Dissertação: Mestrado em Ciência de Alimentos).
- PÉRET-ALMEIDA L., CHERUBINO, A.P.F.; ALVES R.J.; DUFOSSÉ, I.; GLÓRIA, M. A. Separation and determination of the phYsico-chemical characteristics of curcumin, demethoxycurcumin and bisdemethoxycurcumin and bisdemethoxycurcumin. *Food Research International*, v. 38, p. 1039 -1044, 2005.
- PERRENOUD, S. Potassium and Plant Health. 2 Ed. Berne. International Potassio Institute, 1990, 363 p.
- PIETSCH, M. Compostos naturais biologicamente ativos. In: Biotecnologia: Ciência e desenvolvimento. Brasília, DF, n. 4, p. 12-15, 1998.
- RAMIREZ-BOSCA, A.; SOLER, A.; GUTIERREZ, M.A.C. Antioxidant curcuma extracts decrease the blood lipid peroxide levels of human subjects. *Age*, v.18, p.167–169, 1995.
- RAMIREZ-TORTOSA, M.C.; AGUILERA, C.M.; CARRIÓN-GUTIÉRREZ, M.A.; RAMIREZ-BOSCA, A.; GIL, A. Curcumin ethanol-aqueous extract inhibits *in vitro* human low density lipoprotein lipoperoxidation. In : SADLER, M.J.; SALTMARSH, T. (Ed) Functional Foods, the consumer, the products and the evidence, London : *The Royal Society of Chemistry*, p.111-115, 1998.
- RASMUSSEN, H.B.; CHRISTENSEN, S.B.; KVIST, L.P.; KARAZMI, A. A simple and efficient separation of the curcumins, the antiprotozoal constituents of *Curcuma longa*. *Planta Medica*, v. 66, p. 396-398, 2000.
- REDDY, B.S.; CHANDRAKASAN, G. Studies on the metabolism of glycosaminoglycans under the influence of new herbal anti-inflammatory agents. *Biochemical Pharmacology*, v. 38(20), p. 3527-3534, 1989.
- RICHARD, H.; LOO, A. Composition des extraits d'épices et herbes aromatiques. In: RICHARD, H. (Coord.). *Épices et aromates*. Paris: TEC & DOC — Lavoisier, 1992. p. 213–238.

- ROUGHLEY, P.J.; WHITING, D.A. Experiments in the biosynthesis of curcumin. *Journal of Chemical Society*, v, 20, p. 2379 – 2388, 1973.
- SAFFORD, R.J.; GOODWIN, B.F.J. Immunological studies on tartrazine. *International Archives of Allergy and Applied Immunology*, v. 77, n. 3, p. 331-336, 1985.
- SALVI, N.D.; GEORGE, L.; EAPEN, S. Direct regeneration of shoots from immature inflorescence cultures of turmeric. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, n. 62, p. 235-238, 2000.
- SALVI, N.D.; GEORGE, L.; EAPEN, S. Micropropagation and field evaluation of micropropagated plants of turmeric. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, n. 68, p. 143-151, 2002.
- SAN LIN, R.I. Phytochemicals and antioxidants. In: GOLDBERG, I. (ed.). *Functional foods, designer foods, pharmafoods, nutraceuticals*. New York: Chapman & Hall, 1994. p. 409.
- SANTOS, R.I. Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários. In: *Farmacognosia da planta ao medicamento*. SIMÕES et al., Ed. Universidade 2^a ed. Porto Alegre: UFRGS 2000, 821 p.
- SCARTEZZINI, P.; SPERONI, E. Review on some plants of indian traditional medicinal medicine with antioxidant. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 17, p. 23-43, 2000.
- SEMWAL, A.D.; SHARMA, G.K.; ARYA, S.S. Antioxygenic activity of turmeric (*Curcuma longa*) in sunflower oil and Ghee. *Journal of Food Science and Technology*, v.34 (1), p. 67-69, 1997.
- SHOBA, G.; JOY, D.; JOSEPH, T.; MAJEED, M.; RAJENDRAN, R.; SRINIVAS, P.S.S.R. Influence of piperine on the pharmacokinetics of curcumin in animals and human volunteers. *Planta Medica*, v. 64, p. 353-356, 1998.
- SILVA, L.V.; NELSON, D.L.; DRUMOND, M.F.B.; DUFOSSÉ, L.; GLORIA, M.B.A. Comparison of hydrodistillation methods for the deodorization of turmeric. *Food Research International*, v. 38, p. 1087 - 1096, 2005.
- SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; SANTOS, R.I. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*, Ed. Universidade 2^a ed. Porto Alegre: UFRGS 2000, 821 p.
- SIMON, A.; ALLAIS, D.P.; DUROUX, J.L.; BASLY, J.P.; DURAND-FONTAINER, S.; DELAGE, C. Inhibitory effect of curcuminoids on MCF-7 cell proliferation and structure-activity relationship. *Cancer Letters*, v. 129, p. 111-116, 1998.

- SINGH, G.; SINGH, O.P.; MAURYA, S. Chemical and biocidal investigations on essential oils of some Indian curcuma species. *Progress in Crystal Growth and Characterization of Materials*, v.45, p. 75 – 81, 2002 (a).
- SINGH, R.; CHANDRA, R.; BOSE, M.; LUTHRA, P.M. Antibacterial activity of *Curcuma longa* rhizome extract on pathogenic bacteria. *Current Science*, v. 83, n. 6, p. 737–740, 2002(b).
- SOMASUNDARAM, S.; EDMUND, N.A.; MOORE D.T.; SMALLG. W.; SHI, Y.Y.; ORLOWISKI, R.Z. Dietary curcumin inhibits chemotherapy – induced apoptosis in models human breast cancer. *Cancer Research*, v.62, p.3868-3875, 2002.
- SOUZA, C.R.A. *Cúrcuma: caracterização extração e estabilidade*. Belo Horizonte UFMG. Dissertação de mestrado, 1993, 79 p.
- SOUZA, C.R.A.; GLÓRIA, M.B.A. Chemical analysis of turmeric from Minas Gerais, Brazil and comparison of methods for flavour free oleoresin. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v. 41, n. 2, p. 218-224, 1998.
- SRINIVASAN, K.; SAMBAIAH, K.; CHANDRASEKHARA, N. Loss of active principles of common spices during domestic cooking. *Food Chemistry*, v. 43, p. 271-274, 1992.
- SRINIVASAN, K.R. Chromatographic study of the curcuminoids in *Curcuma longa*. *Journal of Pharmacology*, v. 5, p.448-256, 1953.
- SUNITIBALA, H.; DAMAYSNTI, M.; SHARMA, G.J. In vitro propagation and rhizome formation in *Curcuma longa* Linn. *Cytobios*, v.105(109), p. 71-82, 2001.
- TAINTER, D.R.; GRENIS, A.T. *Espécias y aromatizantes alimentarios*. Zaragoza: Ed Acríbia, 251 p. 1996.
- TAKAHASHI, M.Y. *Monografias de corantes naturais para fins alimentícios: padrões de qualidade e identidade*. 2 ed, São Paulo, 1987, 33 p.
- TALLON-NETTO, B.D. *Influência do processamento na qualidade da cúrcuma em pó e dos pigmentos curcuminóides purificados*. Belo Horizonte: Faculdade de Farmácia da UFMG, 2004. 79 p. (Dissertação, Mestrado em Ciência de Alimentos)
- TAYLOR, R.S.L.; EDEL, F.; MANANDAHAR, N.P.; TOWERS, G.H.N. Antimicrobial activities of southern Nepalese medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*, v.50, p.97 – 102, 1996.
- THORPE, T.A. Organogenesis *in vitro*: structural, physiological and biochemical aspects. In- *Perspectives in Plant Cell and Tissue Culture*, Ed. I.K. Vasil. Academic Press, New York, 71-111, 1980.
- TODA, S.; MIYASE, T.; ARICHI, H.; TANIZAWA, H.; TAKINO, Y. Natural antioxidants III: antioxidative components isolated from rhizome of *Curcuma longa* L.).

- SINGH, R.; CHANDRA, R.; BOSE, M.; LUTHRA, P.M. Antibacterial activity of *Curcuma longa* rhizome extract on pathogenic bacteria. *Current Science*, v. 83, n. 6, p. 737–740, 2002(b).
- SOMASUNDARAM, S.; EDMUND, N.A.; MOORE D.T.; SMALLG. W.; SHI, Y.Y.; ORLOWISKI, R.Z. Dietary curcumin inhibits chemotherapy – induced apoptosis in models human breast cancer. *Cancer Research*, v.62, p.3868-3875, 2002.
- SOUZA, C.R.A. *Cúrcuma: caracterização extração e estabilidade*. Belo Horizonte UFMG. Dissertação de mestrado, 1993, 79 p.
- SOUZA, C.R.A.; GLÓRIA, M.B.A. Chemical analysis of turmeric from Minas Gerais, Brazil and comparison of methods for flavour free oleoresin. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v. 41, n. 2, p. 218-224, 1998.
- SRINIVASAN, K.; SAMBAIAH, K.; CHANDRASEKHARA, N. Loss of active principles of common spices during domestic cooking. *Food Chemistry*, v. 43, p. 271-274, 1992.
- SRINIVASAN, K.R. Chromatographic study of the curcuminoids in *Curcuma longa*. *Journal of Pharmacology*, v. 5, p.448-256, 1953.
- SUNITIBALA, H.; DAMAYSNTI, M.; SHARMA, G.J. In vitro propagation and rhizome formation in *Curcuma longa* Linn. *Cytobios*, v.105(109), p. 71-82, 2001.
- TAINTER, D.R.; GRENIS, A.T. *Espécias y aromatizantes alimentarios*. Zaragoza: Ed Acríbia, 251 p. 1996.
- TAKAHASHI, M.Y. *Monografias de corantes naturais para fins alimentícios: padrões de qualidade e identidade*. 2 ed, São Paulo, 1987, 33 p.
- TALLON-NETTO, B.D. *Influência do processamento na qualidade da cúrcuma em pó e dos pigmentos curcuminóides purificados*. Belo Horizonte: Faculdade de Farmácia da UFMG, 2004. 79 p. (Dissertação, Mestrado em Ciência de Alimentos)
- TAYLOR, R.S.L.; EDEL, F.; MANANDAHAR, N.P.; TOWERS, G.H.N. Antimicrobial activities of southern Nepalese medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*, v.50, p.97 – 102, 1996.
- THORPE, T.A. Organogenesis *in vitro*: structural, physiological and biochemical aspects. In- *Perspectives in Plant Cell and Tissue Culture*, Ed. I.K. Vasil. Academic Press, New York, 71-111, 1980.
- TODA, S.; MIYASE, T.; ARICHI, H.; TANIZAWA, H.; TAKINO, Y. Natural antioxidants III: antioxidative components isolated from rhizome of *Curcuma longa* L. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, v. 33, p. 1725 – 1728, 1985.

- TÖNNESEN, H.H.; KARLSEN, J. Studies on curcumin and curcuminoids IX; Investigation of the photobiological activity of curcumin using bacterial indicator systems, *Journal of Pharmaceutical Science*, v.76, p. 373-373, 1987.
- UEARA, S.; YASUDA, I; TAKEVA, C.; ITO KAWA, H. Terpenoids and curcuminoids of the rhizome of *Curcuma xanthorrhiza* Roxb. *Journal of the Pharmaceutical Society of Japan*, v.112(11), p. 817-823, 1992.
- VIASAN, A.C.; MENON, A.N.; RAD, M.J.; NARAYANAN, C.S.; MATHEW, A.G. Chemical analysis of some cultivars of *Curcuma longa* Linn. *Journal of Food Science and Technology*, v. 26, n. 5, p 293 – 295, 1989.
- YASUDA, K.; TSUDA, T.; SHIMIZU, H.; SUGAYA, A. Multiplication of *Curcuma* species by tissue culture. *Planta Medica*, v. 54, p.75-79, 1988.
- ZWAVING, J.H.; BOS, R. Analysis of the essential oils of five *Curcuma* species. *Flavour and Fragrance Journal*, v. 7, p. 19–22, 1992.

APÊNDICES e ANEXOS

APÊNDICE 1

SEPARATION AND DETERMINATION OF THE PHYSICO-CHEMICAL CHARACTERISTICS OF CURCUMIN, DEMETHOXYCURCUMIN AND BISDEMETHOXYCURCUMIN

**PÉRET-ALMEIDA^{1,2}L., CHERUBINO²A. P. F., R ALVES³. J., DUFOSSE⁴L.,
GLÓRIA², M. B. A. ***

¹ *Departamento de Engenharia Agrícola e Solos, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Vitória da Conquista, BA, Brazil*

² *Departamento de Alimentos and* ³ *Departamento de Produtos Farmacêuticos, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Antonio Carlos, 6627, 31270-901, Belo Horizonte, MG, Brazil*

⁴ *Université de Bretagne Occidentale, Quimper, France*

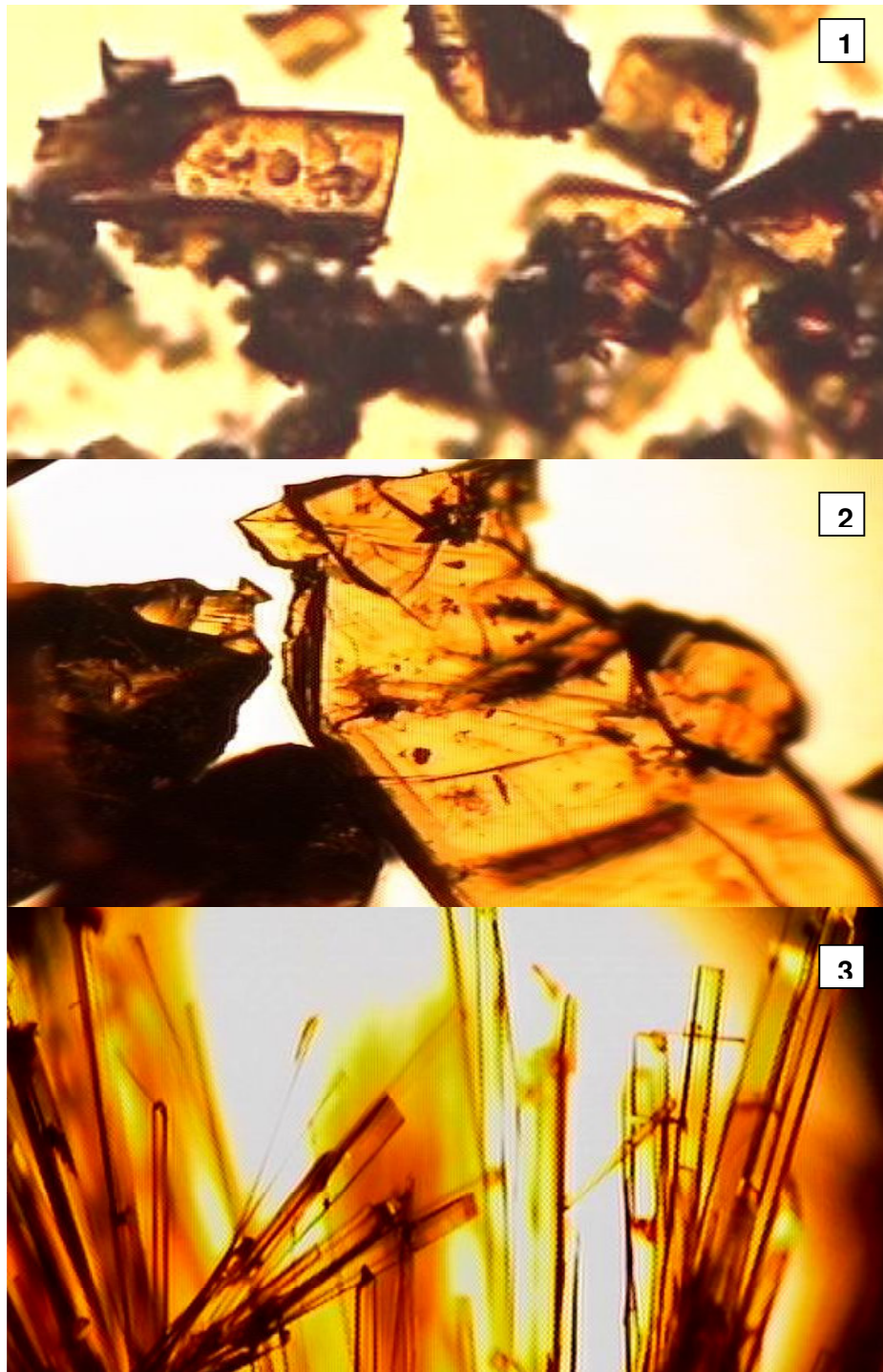
ABSTRACT

The objective of this work was to separate and determine the physico-chemical and color characteristics of isolated curcuminoid pigments. Thin-layer chromatographic separation of curcuminoid pigments was possible on silica gel 60G plates using dichloromethane:methanol, 99:1. The preparative separation of curcuminoid pigments was accomplished by crystallization of curcumin in methanol:water and further separation by column chromatography using silica gel 60G impregnated with sodium hydrogen phosphate and dichloromethane as the eluent. The purity of each curcuminoid pigment was confirmed by high performance liquid chromatography and determination of the melting point. The isolated pigments were characterized with respect to ultraviolet, visible, infrared, nuclear magnetic resonance and color characteristics. The molar absorptivity of each pigment was determined. This data can be used for the identification and quantification of individual curcuminoid pigments.

Keywords: Curcumin; Curcuminoid pigments; Color; NMR; Infrared; TLC

APÊNDICE 2

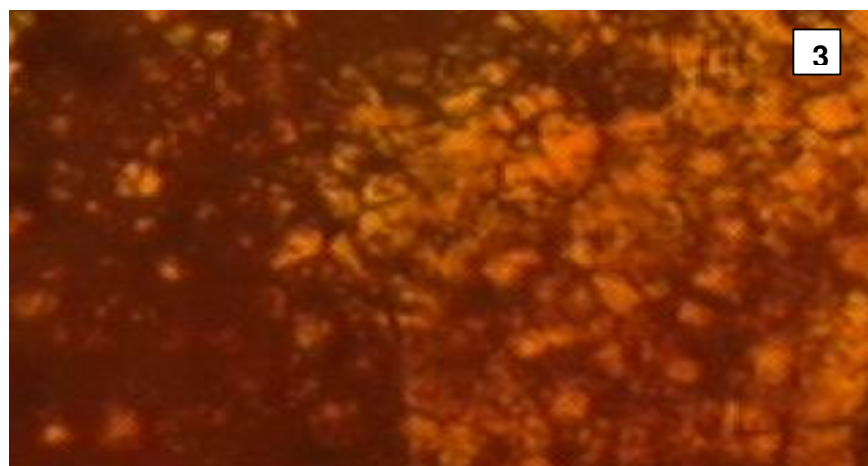
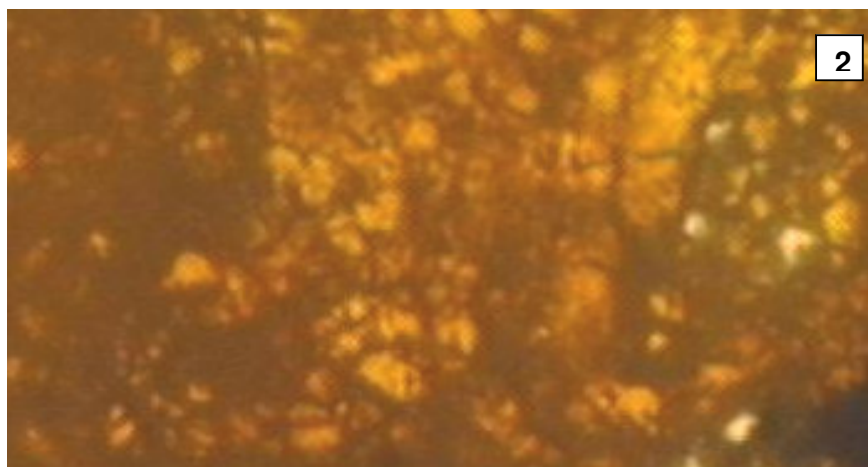
Fotos de cristais de pigmentos isolados com aumento de 100 X



(1) Bidesmetoxicurcumina;(2) Desmetoxicurcumina e (3) Curcumina

APÊNDICE 3

Característica de cor entre dos pigmentos isolados



Diferença de cor entre dos pigmentos isolados avaliadas pelo sistema CIE L*, a* e b*, indicadas na Tabela I. 7 no Capítulo I: (1) bisdesmetoxicurcumina; (2) esmetoxicurcumina e (3) curcumina

APÊNDICE 4

Presença de halos de inibição no estudo da atividade antimicrobiana

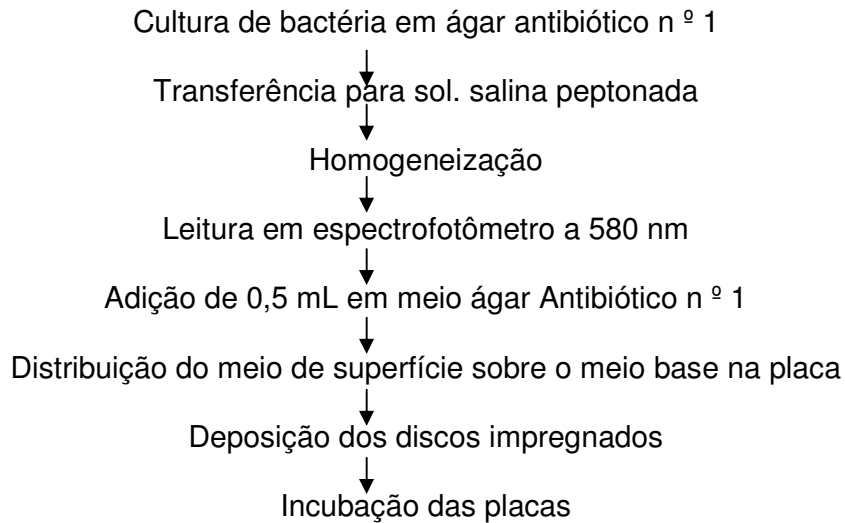
Presença de halos de inibição no estudo da atividade antimicrobiana dos extratos etanólicos da cúrcuma e dos pigmentos curcuminóides

Microrganismo	Presença de halos / extrato etanólico				
	Cúrcuma em pó	Curcumina comercial	Curcumina	DMC	BDMC
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	-	-	-
<i>Bacillus subtilis</i>	-	-	-	-	+
<i>Salmonella choleraesuis</i>	-	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	-	-
<i>Aspergillus niger</i>	-	-	-	-	-
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	-	-	-	-	-
<i>Candida albicans</i>	-	-	-	-	-

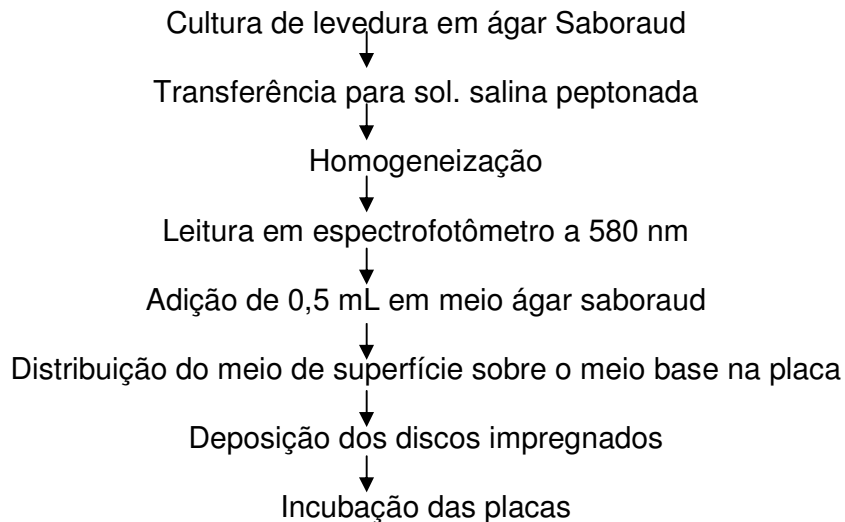
+ = Presença de halo de inibição; - = Ausência de halo de inibição.
DMC = desmetoxicurcumina; BDMC = bisdesmetoxicurcumina.

APÊNDICE 5

Preparo do meio de superfície para *Candida albicans* e *Saccharomyces cerevisiae*



Esquema 1. Preparo do meio de superfície para bactérias



APÊNDICE 6

Preparo do meio de superfície para *Aspergillus niger*

