

UNESP - UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

CÂMPUS DE BOTUCATU

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS

**INTENSIDADE LUMINOSA E EXCLUSÃO DA RADIAÇÃO UV NA PRODUÇÃO
DE *Curcuma longa* L. E PURIFICAÇÃO MAGNÉTICA DE CURCUMINOIDES**

MARIA IZABELA FERREIRA

**Tese apresentada ao Instituto de
Biotecnologia, Câmpus de Botucatu,
UNESP, para obtenção do título de
Doutor em Ciências Biológicas
(Botânica), AC: Fisiologia Vegetal**

BOTUCATU - SP

- 2016 -

UNESP - UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

CÂMPUS DE BOTUCATU

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS

**INTENSIDADE LUMINOSA E EXCLUSÃO DA RADIAÇÃO UV NA PRODUÇÃO
DE *Curcuma longa* L. E PURIFICAÇÃO MAGNÉTICA DE CURCUMINOIDES**

MARIA IZABELA FERREIRA

PROF^a DR^a GIUSEPPINA PACE PEREIRA LIMA

ORIENTADORA

PROF^a DR^a MARCIA ORTIZ MAIO MARQUES

Co-orientadora

**Tese apresentada ao Instituto de
Biotecnologia, Câmpus de Botucatu,
UNESP, para obtenção do título de
Doutor em Ciências Biológicas
(Botânica), AC: Fisiologia Vegetal**

BOTUCATU - SP

- 2016 -

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Ferreira, Maria Izabela.

Intensidade luminosa e exclusão da radiação UV na produção de *Curcuma longa* L. e purificação magnética de curcuminoides / Maria Izabela Ferreira. - Botucatu, 2016

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu
Orientador: Giuseppina Pace Pereira Lima
Coorientador: Marcia Ortiz Maio Marques
Capes: 20303009

1. Cúrcuma. 2. Fotossíntese. 3. Nanopartículas. 4. Compostos bioativos. 5. Cromatografia líquida de alta eficiência.

Palavras-chave: HPLC; açafrão-da-terra; compostos bioativos; fotossíntese; nanopartículas.

AGRADECIMENTOS

A CAPES pela concessão da bolsa de estudos no Brasil e na Itália, ao CNPq e FAPESP pelo auxílio concedido.

À minha orientadora, Profa. Dra. Giuseppina Pace Pereira Lima, pelo exemplo de mulher e de mestre, pela confiança e amizade, por todo o aprendizado, crescimento profissional e pessoal que me proporcionou.

Ao Prof. Dr. Fabio Vianello e sua equipe, Massimiliano, Vitorino, Emauela, Jessica e Davide, pelo acolhimento na Università degli Studi di Padova e por valiosos ensinamentos e experiências durante o período na Itália.

A Dra. Marcia Ortiz Maio Marques pela disponibilidade e ajuda em todos os projetos desenvolvidos durante o doutorado.

Ao Prof. Dr. Lin Chau Ming por todo suporte, conversas enriquecedoras e oportunidades de crescimento.

Aos colegas de pós-graduação: Edilson, pela ajuda nos cálculos e implantação dos tensiômetros. Cleber, pela ajuda com as trocas gasosas, assim como ao casal Mônica e Luan que também me ajudaram muito durante as colheitas. Débora, pela ajuda com as enzimas. Dra. Maíra e ao Dr. Sérgio pelo auxílio nas análises de HPLC. As “minhas meninas”, Aisni e Giovana, estagiárias assíduas e dedicadas que me ajudaram e me ensinaram muito.

Aos funcionários da Fazenda de Ensino Pesquisa e Produção da FCA (São Manoel) por toda a estrutura, disponibilidade e ajuda durante o experimento de campo.

Aos funcionários da seção de Pós-graduação do IBB/UNESP pelo auxílio sempre que necessário.

Ao meu marido e melhor amigo, Murilo, por me ajudar em todos os momentos.

A toda minha família, por me apoiar sempre, ao longo desta caminhada.

A Deus, pela força.

Sumário

RESUMO	7
Abstract.....	8
1. INTRODUÇÃO.....	9
2. OBJETIVOS.....	11
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	12
3.1. Aspectos botânicos de <i>Curcuma longa</i> L.	12
3.2. Aspectos químicos	14
3.3. Importância da espécie.....	16
3.4. Influência da luz na fisiologia das plantas.....	18
3.5. Influência da luz na produção de <i>C. longa</i>	21
3.6. Influência da maturidade na produção vegetal.....	23
3.7. Purificação de curcuminoides com nanopartículas magnéticas	26
CAPÍTULO 1 – “Biomass production and photosynthetic efficiency of turmeric grown in different shade conditions”	30
Resumo.....	31
Abstract.....	32
INTRODUCTION.....	32
MATERIALS AND METHODS	33
RESULTS AND DISCUSSION	33
CONCLUSIONS.....	35
Literature Cited	35
Tables	36
Figures.....	37
CAPÍTULO 2 – “Exclusão da radiação UV solar aumenta o rendimento de curcuminoides em <i>Curcuma longa</i> L.	40
RESUMO	41
Abstract.....	42
1. Introdução.....	42
2. Material e Metodos	44

2.1	Local e delineamento experimental.....	44
2.2	Caracterização dos tratamentos.....	45
2.3	Preparação de amostras e determinação de biomassa	46
2.4	Análises bioquímicas.....	46
2.4.1	Reagentes Químicos.....	46
2.4.2	Extração e estimativa da atividade da PAL (EC 4.3.1.5),	47
2.4.3	Extração e estimativa da atividade da POD (EC 1.11.1.7).....	47
2.4.4	Extração e determinação do teor de fenóis totais (FT).....	47
2.4.5	Determinação do conteúdo de poliaminas (PAs)	48
2.4.6	Determinação do teor de curcuminoides.....	49
2.5	Análise Estaística	49
3.	Resultados e Discussão	50
3.1	Atividade da PAL e teor de fenóis totais (FT)	50
3.2	Atividade da POD e teor de PAS.....	51
3.3	Biomassa e assimilação fotossintética de CO ₂ (A).....	53
3.4	Teor de curcuminoides	54
4.	Conclusão.....	57
5.	Referências.....	57
	CAPÍTULO 3 - "Otimização da produção e da purificação magnética de curcuminoides de <i>Curcuma longa</i> L.	67
	RESUMO	68
	Abstract.....	69
1.	Introdução.....	70
2.	Material e Métodos	72
2.1	Reagentes químicos.....	74
2.2	Instrumentação	75
2.3	Síntese das Surface Active Maghemite Nanoparticles (SAMNs)	75
2.4	Determinação quantitativa de curcuminoides por HPLC.....	76
2.5	Incubação de extratos de <i>C. longa</i> com nanopartículas magnéticas.....	77
2.6	Análise Estatística.....	77
3.	Resultados e Discussão	77

3.1	Efeito da maturidade e das condições de luz no teor de curcuminoides em rizomas de <i>C. longa</i>	77
3.2	Ligação de curcuminoides e nanopartículas magnética	82
3.3	Recuperação de curcuminoides do complexo SAMN@curcuminoides.....	86
4.	Conclusões.....	89
5.	Referências.....	90
4.	APÊNDICE.....	95
5.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	100
6.	CONCLUSÃO GERAL.....	102
7.	REFERÊNCIAS.....	103

FERREIRA, M.I. INTENSIDADE LUMINOSA E EXCLUSÃO DA RADIAÇÃO UV NA PRODUÇÃO DE *Curcuma longa* L. E PURIFICAÇÃO MAGNÉTICA DE CURCUMINOIDES. 2016. 106p. TESE (DOUTORADO) – INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS, UNESP - UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA, BOTUCATU.

RESUMO

Curcuma longa L. é uma monocotiledônea da família Zingiberaceae. É uma importante fonte de curcuminoides e apresenta variações significativas de produtividade em diferentes condições agro-climáticas. No presente trabalho investigamos os efeitos dos níveis de intensidade luminosa e da exclusão da radiação UV solar durante diferentes fases do desenvolvimento de *C. longa* no teor e rendimento de curcuminoides. Também estudamos o desempenho ecofisiológico, a produção de biomassa, a atividade enzimática, o teor de poliaminas e fenóis totais dessas plantas durante o cultivo. Além disso, propusemos a otimização do método de purificação de curcuminoides com nanopartículas magnéticas chamadas Surface Active Maghemite Nanoparticles (SAMNs). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado envolvendo 5 níveis de luminosidade e 4 tempos de colheita, com parcelas subdivididas no tempo, com cinco repetições de 8 plantas. Os níveis de luminosidade foram polietileno anti-uv, pleno sol, 30 %, 50 % e 70 % de sombreamento e as colheitas em diferentes fases do desenvolvimento foram realizadas aos 65, 128, 174 e 203 dias após o plantio (DAP) correspondendo aos meses de janeiro, abril, maio e junho de 2013. O experimento foi conduzido na fazenda experimental da Faculdade de Ciências Agrônômicas da Universidade Estadual Paulista - UNESP, Botucatu - SP, em São Manuel - SP (22°46'0, 571 "S e 48°34'11, 32" W, 744 metros de altitude). Observou-se que nas plantas cultivadas sob exclusão de UV a eficiência fotossintética foi mais elevada durante todo o período de crescimento e esta alta assimilação de CO₂ (*A*) refletiu significativamente no maior acúmulo de biomassa de rizomas e folhas. No final do ciclo de cultivo o teor de fenóis totais (FT), a atividade da peroxidase (POD) e da L-fenilalanina amônio-liase (PAL) aumentaram com a exposição à luz e diminuíram sob exclusão do UV. O conteúdo de Spm foi maior nos rizomas das plantas expostas ao sol, os níveis de Put foram superiores sob exclusão de UV e o teor de curcumina permaneceu inalterado. Notavelmente, as plantas protegidas do UV apresentaram aumento na fotossíntese e, conseqüentemente, na produção de biomassa, levando a um aumento de 44,63 % no rendimento de curcuminoides totais, comparando com as plantas a pleno sol. No entanto, o maior teor destes compostos foi obtido aos 65 DAP, sob 70 % de sombreamento. Este dado é interessante para o processo de purificação, uma vez que nesta fase do desenvolvimento a biomassa é reduzida e o teor de curcuminoides é acentuado. O processo de purificação com nanopartículas magnéticas (SAMNs) foi otimizado considerando a influência da polaridade do solvente e a concentração de nanopartículas, levando a um rendimento de 69,7 mg de curcuminoides g⁻¹ de pó de rizoma de *C. longa*, um aumento correspondente a 17,6 maior em relação ao protocolo anteriormente relatado, levando à recuperação de > 98 % de curcuminoides e oferecendo possibilidades reais para a produção industrial competitiva destes compostos.

Palavras-chave: açafrão-da-terra, fotossíntese, nanopartículas, compostos bioativos, HPLC

FERREIRA, M.I. **LIGHT INTENSITY AND UV EXCLUSION IN *Curcuma longa* L. PRODUCTION AND MAGNETIC CURCUMINOIDS PURIFICATION.** 2016. 106p. THESIS (DOCTOR - BIOLOGICAL SCIENCES/BOTANY) - INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS, UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA.

Abstract

Curcuma longa L. is a monocot of Zingiberaceae family. It is an important source of curcuminoids and its productivity differs significantly in different agro-climatic conditions. In this study we investigate the effects of light intensity levels and exclusion of solar UV radiation during different stages of the *C. longa* development on the content and yield of curcuminoids. We also studied the ecophysiological performance, biomass production, enzymatic activity, the level of polyamines and total phenols of these plants during cultivation. In addition, we proposed the optimization of curcuminoids purification method with magnetic nanoparticles called Surface Active maghemite Nanoparticles (SAMNs). The experimental design was completely randomized with five light levels and four harvests, in a split plot in time, with five replicates of eight plants. Light levels were anti-UV polyethylene, full sun, 30 %, 50 % and 70 % of shading and harvest times were 65, 128, 174, and 203 days after planting (DAP) corresponding to January, April, May, and June 2013. The experiment was conducted in a experimental farm of Agronomic Sciences College, Universidade Estadual Paulista - UNESP, Botucatu - SP, in São Manuel - SP (22°46'0, 571 "S and 48°34'11, 32" W, 744 meters). It was observed that photosynthetic efficiency was higher in plants grown under UV exclusion throughout the growing season and this high CO₂ assimilation (*A*) reflected in significantly higher dry rhizomes and leaves biomass. At the end of the crop cycle total phenols content (TP), peroxidase (POD) and L-phenylalanine ammonia-lyase (PAL) activity increased with decreased exposure to light and under UV exclusion. The Spm content was higher in rhizomes of the plant exposed to full sun, Put levels were higher under UV exclusion and curcumin content remained unaltered. Remarkably, the UV exclusion led to higher CO₂ net assimilation, biomass production and consequently, a notable 44,63 % higher total curcuminoid yield was observed, comparing with full sun plants. However the higher curcuminoid content was obtained at 65 DAP, under 70 % shading. This is interesting for the purification process, since at this developmental stage, the biomass is reduced and curcuminoid content is limited. The curcuminoids purification process with magnetic nanoparticles (SAMNs) has been optimized considering the influence of polarity of the solvent and the concentration of nanoparticles, leading to a yield of 69.7 mg curcuminoids g⁻¹ of *C. longa* powder rhizome, a increase of 17.6 times, compared to the previously reported protocol, leading to the recovery of > 98 % curcuminoids and providing real possibilities for competitive industrial production of curcuminoids.

Keywords: turmeric, photosynthesis, nanoparticles, bioactive compounds, HPLC

1. INTRODUÇÃO

A influência de fatores ambientais e técnicas de cultivo na fisiologia de plantas cultivadas é um importante tópico de pesquisa, pois influenciam o acúmulo de biomassa, bem como a biossíntese de compostos bioativos, alterando a produção e qualidade das plantas. Portanto, determinar as condições de cultivo e o momento adequado para a colheita de uma cultura é importante para aumentar a sua produtividade e qualidade. A biossíntese e acúmulo de compostos fenólicos, por exemplo, está sujeito a variação em função de vários fatores, entre eles a fase do desenvolvimento das plantas (TREUTTER, 2010), a alta intensidade luminosa e a radiação ultravioleta (UV) (MIERZIAK; KOSTYN; KULMA, 2014).

Estas condições de luz são stressantes para as plantas e são uma fonte de radicais livres, pois níveis ambientais de radiação UV solar (280-400 nm) podem conduzir a um aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), provocando efeitos protetores, como a indução da biossíntese de compostos fenólicos que absorvem a radiação UV-B (280-315 nm) (JANSEN; GABA; GREENBERG, 1998) e alterações nas atividades de enzimas antioxidantes, bem como do teor de poliaminas (PAs) (JANSEN et al., 2008)

A luz solar também causa danos ao aparelho fotossintético, principalmente ao fotossistema II (PSII), levando à fotoinibição e perda de desempenho das plantas, e em última análise, suprime a assimilação fotossintética de CO₂ (A), o crescimento e a produtividade. Porém, os comprimentos de onda na faixa do ultravioleta (UV) fazem com que fotoinibição seja muito mais eficiente do que a radiação fotossinteticamente ativa (PAR) (400-700 nm) (TAKAHASHI et al., 2010).

Alguns estudos já foram realizados para determinar a influência da intensidade luminosa na biomassa e na qualidade da *Curcuma longa* (BHUIYAN et al., 2012; HOSSAIN et al., 2009; PADMAPRIYA; CHEZHIAN; SATHIYAMURTHY, 2007; SRIKRISHNAH; SUTHARSAN, 2015), indicando que a espécie tem boa produtividade em ambientes parcialmente sombreados, no entanto, a intensidade de luz adequada para o cultivo da curcuma varia de acordo com o local, ano e nível de irradiância, além disso nada se sabe sobre o efeito da radiação UV sobre essas plantas.

Estudos destinados a correlacionar o tempo de colheita com a biomassa e a produção de curcuminoides foram realizados em diferentes regiões (ASGHARI; MOSTAJERAN;

SHEBLI, 2009; COORAY et al., 1988; HOSSAIN, 2010; KUMAR; GILL, 2009) mostrando que a dependência do teor de curcuminoides do período de colheita ainda é uma questão de interesse, pois o tempo de maturidade da espécie pode variar em diferentes regiões agroclimáticas.

Hoje em dia, a curcumina é usada como suplemento alimentar, em vários países e a base molecular para a sua utilização farmacêutica foi já delineada para uma ampla gama de doenças (GUPTA; KISMALI; AGGARWAL, 2013). Por esta razão, a curcumina e seus derivados estão atraindo um crescente interesse na área de alimentos e farmacêutica.

Assim, o desenvolvimento de diferentes tecnologias de cultivo que visem a melhoria na produção da espécie, e conseqüentemente do açafrão em pó, bem como o incremento no rendimento de curcuminoides puros, visando a purificação dessas moléculas é crucial para otimização do processo de purificação. Entre os protocolos de purificação existentes, separação e purificação por meio de técnicas magnéticas representam alternativas promissoras para captura seletiva e fiável de moléculas específicas (HORÁK et al., 2007).

Recentemente, foi desenvolvido um material superparamagnético nanoestruturado, constituído de maghemita estequiométrica (γ -Fe₂O₃), chamado Surface Active Maghemite Nanoparticles (SAMNs) (MAGRO et al., 2012a) que apresentam os requisitos fundamentais para o desenvolvimento de processos eficazes de purificação magnéticos para biomoléculas em matrizes complexas. As SAMNs já foram utilizadas para imobilizar a curcumina (MAGRO et al., 2014) e um protocolo para a purificação magnética de curcuminoides foi proposto (MAGRO et al., 2015). Portanto, otimizar a produção de *C. longae* a purificação magnética de curcuminoides oferece oportunidades reais de inovação na produção de curcuminoides puros.

2. OBJETIVOS

O objetivo do presente trabalho foi determinar se os níveis de intensidades luminosa e a exclusão da radiação UV solar durante o cultivo de *C.longa* alteram o seu desempenho ecofisiológico e composição química.

Para isso, investigamos os efeitos dessas condições de luz nas trocas gasosas, produção de biomassa, atividade enzimática, teor de fenóis totais, poliaminas e curcuminoides em diferentes fases do desenvolvimento das plantas.

Além disso, buscamos a otimização do método de purificação de curcuminoides com nanopartículas magnéticas chamadas Surface Active Maghemite Nanoparticles (SAMNs).

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Aspectos botânicos de *Curcuma longa* L.

A espécie *Curcuma longa* L. pertence à família Zingiberaceae, foi descrita pela primeira vez pelo biólogo sueco Carl von Linnaeus e publicada no livro *Species Plantarum*, em 1753. A espécie possui três sinônimas *Amomum curcuma* Jacq., *Curcuma domestica* Valetton e *Stissera curcuma* Raeusch além de um basônimo *Kua domestica* (L.) Medik (TROPICOS, 2015). A origem geográfica exata de curcuma é desconhecida, mas uma hipótese segura é que sua origem pode ter sido no Sudeste Asiático. Embora muitas espécies de cúrcuma sejam encontradas na Índia, a maior diversidade de espécies do gênero é encontrada na Índia, Myanmar e Tailândia (NAIR, 2013).

É uma espécie herbácea, perene, caducifolia, aromática, de folhas grandes, longamente pecioladas, invaginantes, oblonga-lanceoladas e obliquo-nervadas. Possui pecíolos tão compridos quanto os limbos, que reunidos em sua base formam o pseudo-caule. As flores são amareladas, pequenas, dispostas em espigas compridas. O rizoma principal ou central é piriforme, arredondado ou ovóide, com ramificações secundárias laterais, menores, mas compridas, também tuberculadas, todas marcadas com anéis de brácteas secas. Cada rizoma mede até 10 cm de comprimento e quando cortados mostram uma superfície de cor vermelho alaranjado. Tem cheiro forte agradável e sabor aromático e picante. A planta atinge em média 120 a 150 centímetros de altura em condições favoráveis de clima e solo (HERTWIG, 1986; LORENZI; MATOS, 2002).

O rizoma é o caule subterrâneo, que pode ser dividido em duas partes, o rizoma central em forma de pêra, chamado "rizoma mãe," e seus ramos axilares laterais conhecidos como "dedos." Normalmente, há apenas um eixo principal. Um dedo completo ou um rizoma mãe é utilizado como material de plantio, que também pode ser chamado de "rizoma semente." Normalmente, o "rizoma semente" produz apenas um eixo principal, que se desenvolve formando uma frondosa folhagem. A base do eixo principal aumenta e torna-se a primeira unidade formada do rizoma, que finalmente se desenvolve em rizoma mãe. Gemas axilares dos nós mais baixos do "rizoma mãe" desenvolvem-se e originam a primeira ordem de ramos, muitas vezes chamado de "dedos primários." O seu número varia de dois a cinco (NAIR, 2013).

A cúrcuma precisa temperaturas entre 20 a 30 °C e alta precipitação anual. Os rizomas amadurecem sob a folha, no solo, são colhidos anualmente e alguns são replantados na temporada seguinte. Depois de seco o rizoma pode ser moído até formar um pó amarelo com um sabor amargo, ligeiramente acre, contudo doce (PRASAD; AGGARWAL, 2011).

3.2. Aspectos químicos

Os constituintes químicos dos rizomas de cúrcuma incluem voláteis e não-voláteis. Os constituintes majoritários do óleo volátil incluem ar-turmerone, zingibereno, turmerone e curlone. Já as substâncias não-voláteis do óleo são compostos fenólicos, conhecidos como curcumina, demetoxicurcumina (DMC) e bisdemetoxicurcumina (BDMC) (JAYAPRAKASHA; JAGAN MOHAN RAO; SAKARIAH, 2005).

Estes pigmentos amarelos conhecidos como curcuminoides são geralmente utilizados como agentes corantes de alimentos e são os principais compostos ativos na cúrcuma. Normalmente, estes polifenóis estão presentes entre 3 e 15 % nos rizomas, sendo a curcumina o principal (LI et al., 2011).

A curcumina é uma molécula altamente pleiotrópica com o potencial de modular a atividade biológica de uma série de moléculas de sinalização. Quimicamente é um diferuloilmetano que contém dois resíduos de ácido ferúlico unidos por uma ponte de metileno (GUPTA; KISMALI; AGGARWAL, 2013). A estrutura química, fórmula e massa molecular, número de registro CAS e nome químico dos curcuminoides podem ser vistos na Tabela 1.

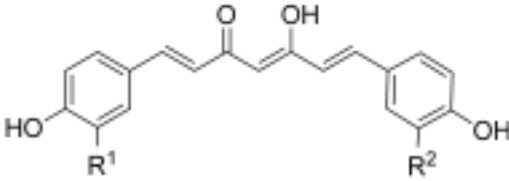
Os curcuminoides podem ser dissolvidos bem em etanol, metanol, acetona e dimetilsulfóxido (LI et al., 2011) sendo que a curcumina é um pigmento também solúvel em óleo, praticamente insolúvel em água a pH ácido e neutro, mas solúvel em pH alcalino. É estável a altas temperaturas e em ácidos, mas instável em condições alcalinas e na presença de luz (KULKARNI et al., 2012).

Devido a dificuldade na separação dos três curcuminoides, os compostos comercialmente puros de curcumina, DMC e BDMC disponíveis como amostras autênticas, puras, são limitados. De acordo com Li et al. (2011) a curcumina comercial "pura" (rotulada como 94 %), na verdade, tem apenas cerca de 70 % de pureza. Consequentemente alguns autores descobriram que em alguns estudos existentes sobre "curcumina" uma mistura dos três curcuminoides foi efetivamente utilizada. No entanto a curcumina pura (> 95 %) é importante para investigações sobre o mecanismo de ação e bioensaios, assim como ensaios clínicos. As investigações sobre a bioatividade dos curcuminoides estão focadas

principalmente nos três principais curcuminoides anteriormente relatados, porém a bioatividade do DMC e do BDMC são ainda inexpressivas.

A curcumina pode também ser produzida por síntese química, porém quando é produzida desta maneira não é utilizada como um aditivo alimentar. Os principais produtos farmacêuticos provenientes da cúrcuma são rizomas inteiros secos, a cúrcuma em pó, os óleos essenciais, a oleoresina e a curcumina. (KANDIANNAN; CHEMPAKAM; KRISHNAMURTHY, 2008).

Tabela 1: Características químicas dos curcuminoides. Curcumina (a); DMC (b) e BDMC (c) (ESATBEYOGLU et al., 2012).

Nome químico (IUPAC)	a) 1,7-Bis-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-hepta-1,6-diene-3,5-dion b) 1-(4-Hydroxyphenyl)-7-(4-hydroxy-3-methoxy-phenyl)-hepta-1,6-diene-3,5-dion c) 1,7-Bis-(4-hydroxyphenyl)-hepta-1,6-diene-3,5-dion
Número CAS	a) 458-37-7 b) 33171-16-3 c) 33171-05-0
Fórmula e massa molecular (g mol⁻¹)	a) C ₂₁ H ₂₀ O ₆ , 368.39 b) C ₂₀ H ₁₈ O ₅ , 338.39 c) C ₁₉ H ₁₆ O ₄ , 308.39
Estrutura química	 <p>a) Curcumina: R1 = R2 = OCH₃ b) Demetoxicurcumina: R1 = H, R2 = OCH₃ c) Bisdemetoxicurcumina: R1 = R2 = H</p>

3.3. Importância da espécie

C. longa é uma espécie medicinal, aromática e condimentar, muito utilizada na culinária e na indústria e tem atraído um interesse considerável nos últimos anos devido ao seu alto potencial medicinal. No Brasil é conhecida popularmente como açafrão-da-terra, cúrcuma, açafrão-da-índia, açafroa, açafroeira, açafroeiro-da-índia, batata amarela, gengibre amarelo, gengibre dourada, magarataia, turmerico, entre outros (LORENZI; MATOS, 2002).

A espécie é amplamente conhecida no mundo pelo seu valor terapêutico nos sistemas tradicionais de medicina indianos e tem sido usada na "medicina ayurvédica" para a cicatrização de feridas, como anti-séptico e anti-inflamatório (KULKARNI et al., 2012). Seu uso também é relatado no tratamento da icterícia e outras doenças do fígado, úlceras, infecções parasitárias, várias doenças da pele, entorses, inflamação das articulações, sintomas de resfriado e gripe. É também utilizada na conservação de alimentos como antimicrobiano (JAYAPRAKASHA; JAGAN MOHAN RAO; SAKARIAH, 2005).

Na indústria a curcumina tem ampla aplicação. Devido a sua propriedade antioxidante, ela pode impedir o ranço dos alimentos e fornecer artigos alimentícios que contenham menos gordura oxidada ou radicais livres. Essa propriedade de anti-oxidação poderosa tem um papel importante em manter o *curry* (tempero da culinária indiana a base de cúrcuma e outras especiarias) por um longo tempo, sem ficar rançoso. A curcumina é usada em produtos lácteos, gorduras, óleos e emulsões lipídicas, sorvetes, frutas e produtos hortícolas, de confeitaria, de cereais, de panificação, carne e produtos de carne, peixe e produtos de peixe, ovos e produtos de ovos, especiarias, sopas, molhos e produtos de proteínas (KULKARNI et al., 2012).

Na medicina a curcumina tem sido amplamente estudada devido ao seu efeito anti-inflamatório, anti-angiogénico, anti-oxidante, para a cicatrização de feridas e contra o câncer (MAHESHWARI et al., 2006).

A bioatividade dos rizomas da cúrcuma está fortemente relacionada à bioatividade dos curcuminoides. De acordo com Jayaprakasha; Rao; Sakariah (2006) os curcuminoides possuem propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias, anti-mutagênicas e protegem o corpo contra agentes mutagênicos, tais como o fumo e outros poluentes.

Investigações recentes sugerem que os curcuminoides são ativos para o tratamento externo de certas doenças cancerosas; esta atividade está provavelmente relacionada com a citotoxicidade destas substâncias, o que foi demonstrado em culturas de células tumorais.

A curcumina disponível comercialmente contém cerca de 17 % de DMC e 3 % de BDMC. É comercializada em vários países, incluindo os Estados Unidos, Índia, Japão, Coreia, Tailândia, China, Turquia, África do Sul, Nepal e Paquistão. Estas preparações incluem, mas não estão limitadas a forma de cápsulas, comprimidos, pomadas, bebidas energéticas, sabonetes e cosméticos (GUPTA; KISMALI; AGGARWAL, 2013).

Investigações sobre a atividade *in vitro* e *in vivo* de extratos de cúrcuma (etanol, metanol, água e acetato de etila) e de “curcumina isolada” ao longo do último meio século mostraram que a curcumina tem demonstrado eficácia contra uma série de doenças humanas. Mais de 65 ensaios clínicos humanos com curcumina foram completados e mais de 35 outros ensaios clínicos estão em curso para avaliar a sua eficácia (LI et al., 2011). Porém, estudos fornecem evidências suficientes de que o uso dos extratos feitos com os rizomas da cúrcuma pode apresentar atividades biológicas superiores em comparação com a curcumina isolada (GUPTA; KISMALI; AGGARWAL, 2013).

Há uma grande demanda por *C. longa* orgânica nos EUA, Alemanha, França e Japão, e uma crescente demanda por corantes naturais na indústria, cadeias de *fast food* e produtos farmacêuticos, os quais contribuem para a valorização do potencial de sua produção biológica (KANDIANNAN; CHEMPAKAM; KRISHNAMURTHY, 2008). A espécie é amplamente cultivada nos trópicos (PRASAD; AGGARWAL, 2011), onde a Índia é líder da produção e exportação (SINGH; PANDA; NAYAK, 2012), no entanto o Brasil tem uma produtividade significativa, com potencial para se tornar um país emergente na sua produção.

Notavelmente, a cúrcuma mostra variações significativas na produtividade das plantas, entre variedades, bem como em plantas cultivadas sob diferentes condições agroclimáticas (NAIR, 2013). Portanto, técnicas agrícolas que aumentam o teor de curcuminoides podem contribuir para melhorar a produção desta importante cultura, uma vez que os valores dos produtos da cúrcuma são baseados em seu teor de curcuminoides.

3.4. *Influência da luz na fisiologia das plantas*

A intensa radiação luminosa pode promover o acúmulo de compostos contendo oxigênio que destroem membranas lipídicas e pigmentos contidos nos cloroplastos. Tais substâncias são denominados Espécies Ativas de Oxigênio (EAOs) os quais incluem o Radical Superóxido (O_2^-), Peróxido de Hidrogênio (H_2O_2), Radical Hidroxila (OH) e Oxigênio “singlet” (O_2^1) (SCANDALIOS, 2005).

Para minimizar os efeitos danosos resultantes da ação desses compostos há a ativação do sistema de defesa antioxidante enzimático, que envolve oxi-redutases como a Superóxido Dismutase (SOD), Peroxidase (POD) e Catalase (CAT) (MALLICK; MOHN, 2000) e do sistema antioxidante não enzimático, que promove a síntese de compostos como GSH (glutathiona reduzida), ácido ascórbico, α -tocoferol, β -caroteno, hidroquinonas e flavonoides (MALLICK; MOHN, 2000).

Além disso, os níveis ambientais de radiação UV solar (280-400 nm) podem representar um stress ambiental para as plantas, conduzindo a um aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) e desencadeando efeitos protetores, como a indução da biossíntese de compostos fenólicos que absorvem comprimentos de onda na faixa da radiação UV-B (JANSEN; GABA; GREENBERG, 1998) e alterações nas atividades de enzimas antioxidantes, bem como no teor em poliaminas (PAS) (JANSEN et al., 2008).

As PAS estão envolvidas em muitos processos fisiológicos, tais como o crescimento, desenvolvimento e tolerância ao estresse a vários fatores ambientais (GILL; TUTEJA, 2010), têm propriedades antioxidantes (FROHNMEYER; STAIGER, 2003) e atua como parte de redes de sinalização complexas, ativadas em resposta a estresses abióticos, incluindo alta e baixa irradiância, temperatura, falta de água, infecção fúngica e ataques de insetos ou mamíferos (BERBERICH; SAGOR; KUSANO, 2015). Além disso as PAS tem um papel regulador na estrutura e funcionamento do aparato fotossintético durante a fotoadaptação em diferentes ambientes de luz e há evidências de que desempenham um papel fotoprotetor durante a exposição do aparato fotossintético a alta intensidade luminosa (SFICHI; LOANNIDIS; KOTZABASIS, 2004). No entanto, não existe consenso em relação aos efeitos da radiação UV-B sobre os níveis de poliaminas em plantas.

De acordo com Jansen e colaboradores (2008), os tratamentos crônicos com doses baixas de UV-B resultam tanto em aumento quanto em redução nos níveis de poliaminas. Em *Phaseolus vulgaris* o conteúdo de PAs livres mostrou uma diminuição acentuada em resposta à radiação UV-B (SMITH; BURRITT; BANNISTER, 2001). Em cultivares de tabaco Lütz e colaboradores (2005) descreveram um aumento do total de PAs como um dos mecanismos de proteção primárias do aparelho fotossintético contra os raios UV-B.

Indução na atividade de enzimas como a L-fenilalanina amônio-liase ([PAL], EC 4.3.1.5), a peroxidase ([POD], EC 1.11.1.7) e várias outras enzimas que participam do metabolismo de compostos fenólicos tem sido relatada como decorrência da exposição a radiação UV-B, com a consequente acumulação de ácidos fenólicos e flavonoides (LAVOLA et al., 2000).

Investigações detalhadas sobre a influencia da intensidade luminosa e da radiação UV focadas no teor de compostos bioativos foram desenvolvidas em diversas espécies, como uva (KOLB et al., 2003), maçãs (SOLOVCHENKO; SCHMITZ-EIBERGER, 2003), tomates (LUTHRIA; MUKHOPADHYAY; KRIZEK, 2006) e alface (TSORMPATSIDIS et al., 2008).

Os níveis de radiação UV influenciaram a biomassa, o teor de compostos fenólicos, flavonoides e a capacidade antioxidante em folhas de alface (Lollo Rosso), segundo (GARCÍA-MACÍAS et al., 2007) sendo que os maiores teores são observados na plantas cultivadas sob maior intensidade de raios UV. Ainda de acordo com os autores, o efeito da radiação UV pode ser inibitória sobre a biomassa, efeito também confirmado por Díaz e colaboradores (2006) e Krizek e colaboradores (1998) que sugeriram que a redução do crescimento em um ambiente com alta radiação UV pode ser devido à lesão do aparelho fotossintético. Outras possibilidades são que a biossíntese de antocianinas, que absorvem a radiação fotossintética do espectro, reduz a capacidade fotossintética das folhas ou que o aumento da produção de compostos secundários atue em concorrência direta para o carbono assimilado para o processo de crescimento das plantas (GARCÍA-MACÍAS et al., 2007).

De forma geral as plantas cultivadas sob baixa irradiação de UVB apresentam menores teores de metabólitos secundários. Em contraste, também foi relatado aumento de determinados compostos fenólicos na ausência de radiação UVB em uvas (KOLB et al., 2003). Porém, estudos com morangos cultivados sob filmes plásticos, que diferem em sua

transparência UV, mostraram que nem o teor de antocianinas, nem a capacidade antioxidante foram afetadas (SOLOVCHENKO; SCHMITZ-EIBERGER, 2003).

Recentemente alguns estudos foram realizados com espécies da família zingiberaceae sobre a influencia da intensidade luminosa na produção e qualidade dos rizomas. Em *Zingiber officinale* o aumento na biossíntese de flavonoides e capacidade antioxidante, determinadas pela redução do ferro (frap) e pelo ensaio com 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl (dpph) nos rizomas das plantas cultivadas sob menor intensidade luminosa foi relatado por Ghasemzadeh e colaboradores (2010), que estudaram o efeito da intensidade luminosa em duas variedades de gengibre cultivados em estufas, sob PAR de 310, 460, 630 e 790 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$.

3.5. Influência da luz na produção de *C. longa*

C. longa é uma monocotiledônea que apresenta metabolismo fotossintético do tipo C₃ (MARCHESE et al., 2006). Nas plantas desse grupo o aumento da intensidade luminosa não aumenta a assimilação de CO₂ (A), pois seu aparelho fotossintético satura com um terço da radiação solar. Assim, quantidades de luz superiores a esta razão podem proporcionar condições de stress e refletir negativamente sobre a produtividade (LARCHER, 2000).

A radiação UV-B também gera estresse nas plantas, aumentando a atividade da enzima L-fenilalanina amônio-liase (PAL) e conseqüentemente o acúmulo de ácidos fenólicos e flavonoides (LAVOLA et al., 2000). Assim, a PAL se destaca como enzima chave e regulatória da via do ácido chiquímico, catalisando o primeiro passo para a biossíntese dos fenólicos vegetais, a transformação da fenilalanina em ácido trans-cinâmico (CHENG et al., 2001). Além disso, segundo Katsuyama e colaboradores (2009) os substratos de partida na síntese de curcuminoides em *C. longa* (cinamoil-CoA, p-coumaroil-CoA ou feruloil-CoA) são sintetizados a partir de fenilalanina pela a atividade da PAL (Figura 1). Portanto a indução da atividade dessa enzima poderia levar a um aumento dos substratos de partida na síntese de curcuminoides, e conseqüentemente destes últimos.

Alguns estudos já foram realizados para determinar a influência da luz sobre a biomassa e a produção de curcuminoides em *C. longa*. Padmapriya; Chezhiyan; Sathiyamurthy (2007) estudaram a influência do sombreamento parcial e da fertilização em Coimbatore, Índia. Os resultados mostram que plantas cultivadas sob sombreamento de 25 a 30 % apresentaram aumento no conteúdo de clorofila total, fenóis totais, curcumina (5,57 %) e óleo essencial (5,68 %), além de ter registrado o maior rendimento por parcela.

O efeito da diminuição da intensidade luminosa no crescimento, produtividade e teor de curcumina foi estudado por (HOSSAIN et al., 2009), em Okinawa, Japão. No primeiro experimento testaram 100, 82, 79, 73, e 59 % de luz, concluindo que o teor de curcumina diminui quando *C. longa* é cultivada entre 59 e 73 % de luz, ou seja, entre 27 e 41 % de sombreamento. No segundo experimento testaram 100, 68, 52 e 48 % de intensidade luminosa, concluindo que a redução acentuada (48 – 68 %) da luminosidade resulta em efeito antagônico ao acúmulo de curcumina.

No Sri Lanka um experimento foi conduzido para avaliar o crescimento e desenvolvimento da cúrcuma em quatro diferentes níveis de sombreamento. Os resultados indicaram que a área folhar; a biomassa e o rendimento foram significativamente mais elevados em 50 %, seguido por 70 % e 0 % de nível de sombra. Os autores concluem que os níveis superiores de radiação teriam causado a destruição de pigmentos fotossintéticos e, portanto, redução no crescimento, já sob 70 % e 80 % de sombreamento, a quantidade de radiação solar recebida pelas plantas não foram suficientes para uma ótima fotossíntese, (SRIKRISHNAH; SUTHARSAN, 2015).

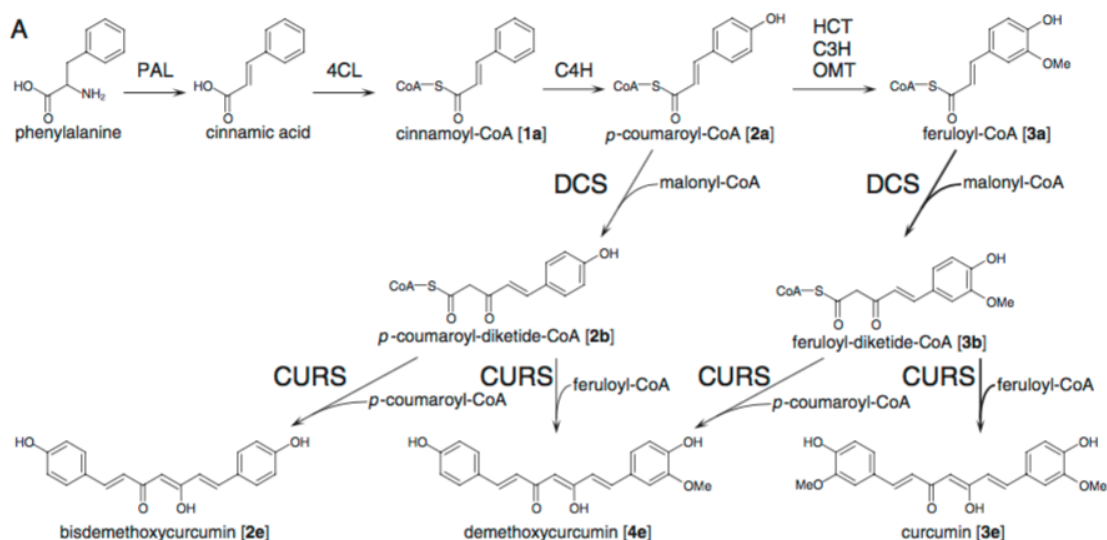


Figura 1: Biossíntese de curcuminoides por proposta por Katsuyama e colaboradores, (2009). Os substratos de partida, cinnamoyl-CoA (1a), p-coumaroyl-CoA (2a), ou feruloyl-CoA (3a), são sintetizados a partir da fenilalanina por a atividade da L-fenilalanina amônio-liase (PAL), 4-cumarato:CoA ligase (4CL), cinamato-4-hidroxilase (C4H), hidroxicinamoyl transferase (HCT), cinamato-3-hidroxilase-(C3H), e O-metiltransferase (OMT). DCS catalisa a formação da dicetona-CoA por condensação de p-coumaroyl-CoA e feruloyl-CoA com malonyl-CoA. CURS catalisa a formação de curcuminoides pela condensação de dicetide-CoAs com substratos iniciais.

3.6. *Influência da maturidade na produção vegetal*

Durante a ontogenia as plantas passam por diferentes fases, com distintas características morfológicas e fisiológicas, sendo que o estágio de desenvolvimento em que um vegetal é colhido pode influenciar no teor de seus fitoquímicos (HACKETT, 2002). A concentração de flavonoides e ácidos fenólicos, por exemplo, está sujeita a variação ao longo do desenvolvimento das plantas (TREUTTER, 2010), por isso, determinar o momento adequado para colher uma espécie de planta é importante para aumentar a sua produtividade e qualidade.

Em brócolis o estágio de desenvolvimento após a formação da cabeça apresentou os maiores teores de quercetina e kampferol (KRUMBEIN, ANGELIKA, SAEGER-FINK HEIDI, 2007). A concentração total de flavonoides e de derivados do ácido cafeoil-quinico, ferúlico e sinápico em brócolis aumentaram do primeiro estágio de desenvolvimento até a maturidade (VALLEJO; GARCÍA-VIGUERA; TOMÁS-BARBERÁN, 2003). No entanto em espinafre, descobriu-se que as folhas jovens tem maior concentração de flavonoides totais (BERGQUIST et al., 2005). Pimentão imaturo apresentou teores elevados de flavonoides, enquanto pimentões maduros apresentaram teores de 4 a 5 vezes menores (MARÍN et al., 2004), além disso, os glicosídeos de flavonóis diminuíram com a crescente idade das folhas de pêra (ANDREOTTI; COSTA; TREUTTER, 2006). Portanto, cada espécie e órgão vegetal apresenta suas particularidades em relação aos teores de compostos fenólicos.

Estudos relacionados a produção de curcuminoides em *C. longa* mostram variações significativas em diferentes ambientes, variedades, tratamentos pós-colheita, locais e estádios de desenvolvimento. A variação na concentração curcuminoides é bem conhecida entre variedades de *C. longa* (WANG; HU; WANG, 1999). Em plantas que crescem em diferentes habitats o teor de curcuminoides produzidos pelos rizomas foi afetado. Um estudo conduzido no Japão mostrou que o teor de curcumina nos rizomas de plantas cultivadas em diferentes tipos de solo pode sofrer alterações de até 200% (HOSSAIN; ISHIMINE, 2005).

Fatores climáticos e disponibilidade hídrica também afetam a qualidade dos rizomas. Níveis mais elevados de curcuminoides totais e individuais foram verificados em plantas de cúrcuma cultivadas em região onde as chuvas ocorrem durante todo o ano, no sul da Tailândia (POTHITIRAT; GRITSANAPAN, 2008).

O processamento pos-colheita da cúrcuma também é um fator importante, pois influencia o teor de curcuminoides. No entanto, alguns relatos são controversos. Por exemplo, um estudo descobriu que a concentração de curcumina foi reduzida 27 a 53 % após o processamento térmico de cura com água fervente (SURESH; MANJUNATHA; SRINIVASAN, 2007), entretanto outra investigação indica que o tratamento térmico com água fervente antes da desidratação aumentou os níveis de curcuminoides (BAMBIRRA; JUNQUEIRA; GLÓRIA, 2002).

O efeito da maturidade tem impacto significativo na produção e na composição química de cúrcuma, e variam de acordo com as regiões de cultivo, e provavelmente com o genótipo estudado. Cooray e colaboradores (1988) estudaram o efeito da maturidade sobre a produção de rizomas, teor de óleo essencial e curcuminoides na principal cultivar de *C. longa* do Sri Lanka. Os autores relatam que o teor de curcumina atinge um máximo em torno de 5,5 meses, porém o tempo ótimo de colheita para a produção máxima de rizoma e curcumina por planta foi atingido cerca de 9 meses após o plantio. Ainda observaram que após este período, o avanço da maturidade resultou em um declínio na produção de curcumina total. Porém, Kumar; Gill (2009) estudaram a influência da época de colheita em Ludhiana (Punjab), Índia, e descobriram que o número e a massa de rizomas aumentou significativamente com o atraso na colheita, indicando que a colheita tardia, após a senescência total das folhas, proporciona um aumento também no teor de óleo essencial e curcumina.

Asghari; Mostajeran; Shebli (2009) avaliaram a composição do óleo essencial, bem como o teor curcuminoides em diferentes estágios de crescimento da cúrcuma cultivada em Isfahan, Irã, e descobriram que as plantas atingem os seus valores máximos, 2,7 % de curcuminoides, aos 10 meses de idade e o sua massa é correlacionada ao teor em curcumina. Hossain (2010) avaliou os efeitos do tempo de colheita sobre o acúmulo de biomassa de cúrcuma para determinar o tempo de colheita crítico em Okinawa, Japão, e relata que o rendimento máximo de rizoma é obtido quando a parte aérea murcha completamente.

Já de acordo com Manhas; Gill (2012) a absorção de nutrientes, o rendimento e os parâmetros de qualidade não foram afetados por diferentes épocas de colheita em Ludhiana (Punjab), Índia. Esses estudos indicam que o tempo adequado para se realizar a colheita da *C. longa* varia de acordo com alguns fatores que influenciam o metabolismo das plantas, tais como variedade, características edafo-climáticas e disponibilidade hídrica, entre outros. Daí a

importância de se determinar o melhor tempo de colheita para cada variedade, dentro de sua região agro-climática.

Algumas investigações fisiológicas sobre o crescimento e desenvolvimento da cúrcuma e a síntese de metabólitos secundários já foram conduzidas. Segundo Dixit; Srivastava (2000a) a maior parte do $^{14}\text{CO}_2$ assimilado na fotossíntese é translocado para os rizomas e os metabólitos produzidos na via fotossintética são incorporados na formação da curcumina, sendo a capacidade fotossintética das folhas um dos fatores regulatórios da biossíntese e acúmulo de curcuminoides. Segundo os mesmos autores a curcumina é sintetizada nas folhas e acumulada nos rizomas (DIXIT; SRIVASTAVA, 2000b).

Dixit; Srivastava (2000b) relatam que a quantidade de metabólitos translocados das folhas para os rizomas influencia o particionamento de fotoassimilados, o tamanho, a biomassa e também a biossíntese e acúmulo de curcumina. Por isso a partição de fotoassimilados para o rizoma (dreno), pode ser um dos fatores que controlam a produtividade, além da capacidade de biossíntese do rizoma. Os mesmos autores também relatam que a incorporação de $^{14}\text{CO}_2$ nos metabólitos secundários diminuiu com o amadurecimento das folhas, pois a translocação é maior em plantas mais jovens, fisiologicamente mais ativas, diminuindo ao longo do tempo (DIXIT; SRIVASTAVA, 2000a). Porém, de acordo com Katsuyama e colaboradores (2009) os níveis de expressão dos genes que codificam a síntese de enzimas envolvidas na biossíntese da curcumina [dicetona-CoA-sintase (DCS) e curcumina sintase (CURS)] foram maiores no rizoma do que na folha, indicando que a síntese de curcumina é mais eficiente nos rizomas do que nas folhas.

Entender a correlação entre a assimilação de carbono e o acúmulo de metabólitos secundários durante o crescimento e desenvolvimento de uma espécie é uma área importante da biologia funcional, principalmente quando relacionada a compostos secundários de grande valor farmacêutico e importância econômica (SRIVASTAVA; SHARMA; MISRA, 2006).

3.7. Purificação de curcuminoides com nanopartículas magnéticas

As indústrias alimentícias e farmacêuticas geralmente empregam vários métodos cromatográficos, de ultrafiltração ou precipitação para isolar biomoléculas de interesse (KITTS; WEILER, 2003). Numerosos estudos foram realizados para separar pigmentos curcuminoides por cromatografia em camada delgada e cromatografia em coluna. Além de métodos de HPLC, que são mais sensíveis e precisos para a detecção e quantificação de curcuminoides no extrato do rizoma de *C. longa* (KULKARNI et al., 2012).

Porém estas técnicas mostram desvantagens significativas quando aplicadas à escala industrial, tais como a instrumentação dispendiosa, procedimentos demorados e grandes quantidades de solventes orgânicos e resíduos. Em particular, a principal desvantagem de todos os procedimentos de cromatografia líquidos em coluna é a impossibilidade de lidar com amostras biológicas contendo material particulado. Estas técnicas não são adequadas para trabalhar nos estágios iniciais do processo de isolamento/purificação, quando sólidos em suspensão e componentes incrustantes estiverem presentes na amostra (TURKOVÁ, 1978).

Entre os protocolos de purificação existentes, a separação e purificação por meio de técnicas magnéticas representam alternativas promissoras para captura seletiva e fiável de moléculas específicas (HORÁK et al., 2007). Técnicas de separação magnética apresentam algumas vantagens em comparação com os procedimentos de separação padrão. São frequentemente caracterizadas pela extrema facilidade do processo. Além disso, sistemas dispendiosos de cromatografia líquida, centrífugas, filtros ou outras instrumentações não são necessárias.

O processo de separação pode ser realizado diretamente em amostras brutas que contêm sólidos em suspensão. Como uma outra vantagem em relação a técnicas cromatográficas padrão, as separações magnéticas não requerem grandes volumes de solventes; assim, uma excessiva diluição da molécula alvo em solução é evitada (MAGRO et al., 2015).

Para que nanopartículas magnéticas sejam um concorrente real para tecnologias padrão de purificação é necessário que respondam à requisitos específicos, isto é, estabilidade coloidal, reatividade de superfície adequada e superparamagnetismo (MACKAY, 2006). Recentemente, foi desenvolvido um processo de síntese para um material

superparamagnético nanoestruturado na faixa de tamanho de cerca de 10 nm, constituído de maghemita estequiométrica (γ -Fe₂O₃), o qual mostra uma superfície com comportamento químico peculiar, chamada Surface Active Maghemite Nanoparticles (SAMNs). Estas nanopartículas apresentam um momento magnético médio alto e alta estabilidade em água, como suspensões coloidais, sem qualquer modificação superficial ou derivação de revestimento (MAGRO et al., 2012a).

Devido às suas propriedades físicas e químicas únicas, estas nanopartículas de óxido de ferro nuas são atualmente utilizadas para imobilizar várias biomoléculas (SINIGAGLIA et al., 2012; VENERANDO et al., 2013) e apresentam os requisitos fundamentais para o desenvolvimento de processos eficazes de purificação magnéticos para biomoléculas em matrizes complexas.

As SAMNs já foram utilizadas para imobilizar a curcumina (MAGRO et al., 2014) e um protocolo para a purificação magnética de curcuminóides foi proposto (MAGRO et al., 2015). Porém, é possível propor adaptações técnicas para a otimização do método de purificação dos curcuminóides, buscando aumentar o rendimento. Considerando que a interação das moléculas de curcumina com a superfície das SAMNs pode ser favorecida pela maior polaridade do solvente.

Segundo Magro e colaboradores (2015) a melhor condição de extração de curcuminóides, em termos de rendimento, foi a mais elevada concentração de etanol (99,6 %), porém, apresentou as piores condições de ligação com as SAMNs. Por outro lado, quando as nanopartículas ligadas aos curcuminóides (complexo SAMN@curcuminóides) foram incubadas em 99,6 % de etanol puro, o equilíbrio conduziu à dissociação dos complexos, sendo possível a recuperação desses curcuminóides.

De acordo com o princípio de Le Châtelier, a elevada concentração de curcuminóides no extrato etanólico favorece fortemente a ligação durante a incubação para a formação do complexo com as nanopartículas. Assim, ainda que na presença do etanol, os curcuminóides competiram com sucesso pela ligação com as SAMNs, é possível a viabilização da purificação. Porém, a porcentagem de formação de complexos SAMN@curcuminóides ainda é baixa, apesar da considerável habilidade da curcumina em formar complexos estáveis com o ferro (III) (BORSARI et al., 2002).

Assim a otimização do processo de purificação partindo da influencia da polaridade do solvente utilizado durante o processo de incubação e a concentração adequada das SAMNs é importante para viabilizar um maior rendimento de purificação magnética de curcuminoides.

Esta tese foi dividida em capítulos, os quais constituem artigos redigidos segundo as normas das revistas selecionadas para publicação.

- **CAPÍTULO 1: “Produção de biomassa e eficiência fotossintética do açafrão-da-terra cultivado em diferentes ambientes luminosos”**

Submetido para publicação no periódico “*Acta Horticulturae*”.

- **CAPÍTULO 2: “Exclusão da radiação solar UV aumenta o rendimento de curcuminoides em *Curcuma longa* L.”**

Submetido para publicação no periódico “*Industrial Crops and Products*”.

- **CAPÍTULO 3: “Otimização da produção e da purificação magnética de curcuminoides de *Curcuma longa* L. ”**

Submetido para publicação no periódico “*Food Chemistry*”.

CAPÍTULO 1 – “Biomass production and photosynthetic efficiency of turmeric grown in different shade conditions”

Produção de Biomassa e Eficiência Fotossintética de *Curcuma* cultivada sob diferentes condições de sombreamento

RESUMO

A produção de biomassa é direta ou indiretamente depende de luz. Neste trabalho avaliamos a produção de biomassa de açafrão-da-terra (*Curcuma longa* L.) cultivada sob polietileno anti-UV, a pleno sol, 30 %, 50 % e 70 % de sombreamento, em quatro tempos de colheita. O objetivo foi avaliar a eficiência fotossintética e a produção de biomassa de folhas e rizomas. Os resultados mostram que as plantas cultivadas sob polietileno anti-UV apresentaram parâmetros de eficiência fotossintética superiores (A , A/E e gs) aos 114, 169 e 201 DAP. Estas plantas também apresentaram menor $Tleaf$ ao longo do período de cultivo. Isso refletiu na produção significativamente maior de rizomas e folhas. Conclui-se que o filme de polietileno anti-UV proporcionou melhor eficiência fotossintética e produção de biomassa para o crescimento de *C. longa*.

Palavras-chave: *Curcuma longa* L., níveis de luz, produtividade, rizoma.

Biomass Production and Photosynthetic Efficiency of Turmeric Grown in Different Shade Conditions

Keywords: *Curcuma longa* L., light levels, productivity, rhizome.

Abstract

Biomass production is directly or indirectly depends upon light. This experiment studied biomass production in turmeric (*Curcuma longa* L.) grown at anti-UV polyethylene, full sun, 30 %, 50 %, and 70 % shade, in four harvests time. Our objective was to evaluate photosynthetic efficiency, leaf and rhizomes biomass production. The results show that plants grown under polyethylene showed higher photosynthetic efficiency parameters (*A*, *A/E* and *gs*) at 114, 169 and 201 DAP. These plants also had lower Tleaf over the period of cultivation. This was reflected in significantly higher production of rhizomes and leaf. We conclude that anti-UV polyethylene film provided better photosynthetic efficiency and biomass production for the growth of *C. longa*.

INTRODUCTION

Turmeric (*Curcuma longa* L.) is an herbaceous perennial plant of the family Zingiberaceae, native of southern India tropical forests (Govindarajan, 1980) widely used in culinary, in food, pharmaceuticals and textile industry. *C. longa* is a monocot species, therefore presents C3 type photosynthesis metabolism (Marchese et al. 2006). In plants of this group increased light intensity does not increased photosynthetic rate, because the photosynthetic apparatus of these plants saturates with one third of the solar radiation, thereby, light amounts above this ratio can provide stress conditions in these plants, reflecting negatively on their productive characteristics.

The increase or decrease in productivity can be observed due to different light levels provided by different protected environments and harvest time, in as much as the age and environmental changes can promote different responses in physiological, biochemical, anatomical and growth characteristics of this plant, hence may alter the chemical composition and biological activity.

Thus, plants grown under full sun can have higher stress conditions than plants grown in a protected environment, especially under anti-UV polyethylene, due to the high intensity of radiation received by the leaves.

The aim of this study was to evaluate biomass production and photosynthetic efficiency of turmeric cultivated under protected environment coated with anti-UV polyethylene and distinct shade screens in four harvest times.

MATERIALS AND METHODS

The experiment was conducted in an experimental farm of Agronomic Sciences College, Universidade Estadual Paulista - UNESP, Botucatu - SP, in São Manuel - SP (22°46'0, 571 "S and 48°34'11, 32" W, 744 meters).

The experimental design was completely randomized with five light levels and four harvests, in a split plot in time, with five replicates of six plants. Light levels were anti-UV polyethylene, full sun, 30 %, 50 % and 70 % of shading and harvest times were 65, 128, 174, and 203 days after planting (DAP) corresponding to January, April, May, and June 2013. Light levels were obtained by protected environment in high tunnel structure, with 3 m wide, 1.70 m high and 22.5 m long, with different coatings: polyethylene film anti-UV (150 μm), shade screen with 70 %, 50 % and 30 % of shading and fully exposed to sunlight, with the same dimension environment.

Gas exchange parameters were evaluated at 62, 114, 169, and 201 DAP, using a Portable Photosynthesis System (LI-6400, Licor) with radiation inside the chamber standardized to 1500 μmol (FFFA) $\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$. The measurements were performed from 09:00 to 11:00 AM and the photosynthetic parameters evaluated were CO_2 net assimilation (A); stomatal conductance (g_s); internal CO_2 concentration (C_i); leaf transpiration (E); leaf temperature (T_{leaf}) and; water use efficiency (A/E), performed in six plants per plot.

At harvests the plants were cleaned, shoots were separated from rhizomes and dried (leaves at 40°C and rhizomes at 65 \pm 5 °C) until the plants reached a constant weight. Results of the biomass production were subjected to variance analysis and regression and means were compared by Tukey test at 5 % probability, according to the package Assitac 7.7 beta (Silva and Azevedo, 2008).

RESULTS AND DISCUSSION

The CO_2 assimilation (A) measured in plants grown in different environments were similar, at 62 DAP, except in full sun, where A was lower than in the other light conditions environments (Figure 1A). At 114 and 169 DAP, only the environment coated with polyethylene reached values higher than 10 $\mu\text{molCO}_2\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ and at 201 DAP plants cultivated under all light environments were in leaf senescence, which reduced A values, so, cellular respiration was already higher than the total photosynthesis.

The fact that CO_2 assimilation (A) was higher in environment coated with polyethylene may be related to lower external interference on cultivation environment in high-protected tunnel cultivation, according to Cardoso et al. (2008), this type of environment acts as a physical barrier to the wind, which can reduce about 90 % of the daily average speed.

Chavarria et al. (2007) emphasize that the coverage with polyethylene decreases steam pressure deficit and consequently increases the stomatal conductance (g_s).

One can expect that the values of g_s in the environment with polyethylene are higher, and in this study that the g_s values (Figure 1B) were slightly higher at 62 and 201 DAP and reached the maximum rate at 114 DAP (0.65 $\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Even though more stomata open, due to the higher g_s , no pronounced effect was observed in leaf transpiration (E), which promotes the diffusion of atmospheric CO_2 for, the environment covered with polyethylene (Figure 1C).

Both E and internal CO_2 concentration (C_i), however, were not significantly influenced by environments. Leaf temperature (T_{leaf}) also remained similar; except for the decrease at 169 DAP (22.44°C), in environment coated with polyethylene.

In a classic experiment in plant physiology, Farquhar and Sharkey (1982) found that the increase in C_i promotes linear increase in A , until the saturation point for CO_2 , limited by the regenerative capacity of RuBP2. Thus, even a small rise in C_i values was not enough to keep A at the end of the cycle, at 203 DAP. In addition, biochemical processes, particularly chlorophyll degradation, is the most limiting events of photosynthesis in early senescence leaves, even more than stomatal function (Dai, Edwards and Ku, 1992).

This was also evident in the A/E , which allows us to infer about the water use efficiency in photosynthesis, for the amount of H_2O needed for CO_2 assimilation is considered. At 169 and 201 DAP, which was the main period of translocation of carbohydrates in turmeric, plants under polyethylene showed values between 3.44 and -0.8 micromol $\text{CO}_2/\text{mmol H}_2\text{O}$, respectively.

At this stage, the plants also showed decrease in leaf biomass production, and significant effect on interaction between light levels and days after planting was observed. Table 1 shows leaves and rhizomes dry biomass of plants cultivated under different lighting environments and harvests times. At 65 DAP were not observed significant differences between plants cultivated in different lighting. At 128, 174, and 203 DAP environment with polyethylene showed higher total dry leaves biomass, but at 203 DAP environments with 70 % and 50 % shading were no differentiated.

The regression equations related to the dry leaves and rhizomes biomass, in different environments, subjected to days after planting is presented in Table 2. According to the equations all treatments adhered to the quadratic regression model, showing that the environment covered with polyethylene favored the higher leaf dry mass accumulation (Figure 2), with maximum production reaching past 138 DAP, with 31.41 g per plant. The second largest leaf production occurred in environment with 50 % shading, at 137 DAP with 21.57 g. Less favorable lighting conditions to plants was full sun, although they achieve maximum production at 136 DAP, did not exceed 15.56 g.

Similar results were observed by Cecilio Filho (2004) who found that greatest amount of nutrients is accumulated from 100 - 120 days after planting, because in this period the biomass is strongly increased.

In environments with 30 % and 70 % of shading there was no difference in production, however, under 30 % of shading the plants reached the maximum value eight days before plants grown under 70 % of shade. From these points, all environments have reduced leaf dry mass, which is related to the ontogeny and the source-sink relationship, because senescence leaves translocate assimilates to rhizomes, which continue to develop (Table 1), with a linear increase of biomass (Figure 3).

Plants grown in an environment with polyethylene stood out over other ones at 174 and 203 DAP (Table 1) and the highest rhizomes yield was also observed in this environment, at 203 DAP with 132.84 g.

CONCLUSIONS

Excess solar radiation is harmful to plants grown under full sun, negatively affecting productivity; therefore, to achieve better photosynthetic efficiency and productivity, *C. longa* cultivation under environment covered with anti-UV polyethylene film is indicated.

ACKNOWLEDGEMENTS

Thanks to CAPES and FAPESP for financial assistance.

Literature Cited

- Cardoso, L.S. et al. 2008. Alterações micrometeorológicas em vinhedos pelo uso de coberturas de plástico. Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília, .441-447, 2008.
- Dai, Z.; Edwards and G. E.; ku, M.S.B. 1992. Control of photosynthesis and stomatal conductance in *Ricinus communis* L. (Castor Bean) by leaf to air vapor pressure deficit. Plant Physiology, Rockville, 99:1426-1434.
- Farquhar G.D. and Sharkey, T.D. 1982. Stomatal conductance and photosynthesis. Annual Review of Plant Physiology, 33:317-345.
- Govindarjan, V.S. 1980. Turmeric: chemistry, technology and quality. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 13(3):199-301.
- Marchese, J.A. et al. 2006. Carbon isotope composition as a tool to control the quality of herbs and medicinal plants. Photosynthetica, 44(1):155-159.
- Silva, F.A.S. and Azevedo, C.A.V. 2008. Versão do programa computacional Assistat: Assistência Estatística – para sistema operacional Windows. Universidade Federal de Campina Grande, Campus 1. Campina Grande.

Tables

Table 1. Influence of different lighting conditions treatments and days after planting (DAP) in dried leaves and rhizomes of turmeric. São Manuel-SP, 2012-2013.

Lighting conditions	65 DAP	128 DAP	174 DAP	203 DAP
Leaves (g plant ⁻¹)				
Polyethylene	3.61 a	30.44 a	24.00 a	8.40 a
70%	4.06 a	19.07 bc	18.52 b	10.33 a
50%	4.02 a	20.93 b	18.14 b	6.94 ab
30%	4.46 a	18.39 bc	17.41 b	3.12 b
fullsun	3.48 a	14.90 c	11.41 c	3.56 b
Rhizomes (g plant ⁻¹)				
Polyethylene	5.73 a	45.69 a	98.60 a	132.84 a
70%	5.93 a	23.36 b	58.88 b	79.47 cd
50%	5.84 a	29.67 ab	70.20 b	104.74 b
30%	5.14 a	24.96 b	72.29 b	90.07 bc
fullsun	4.11 a	20.52 b	39.83 c	72.69 d

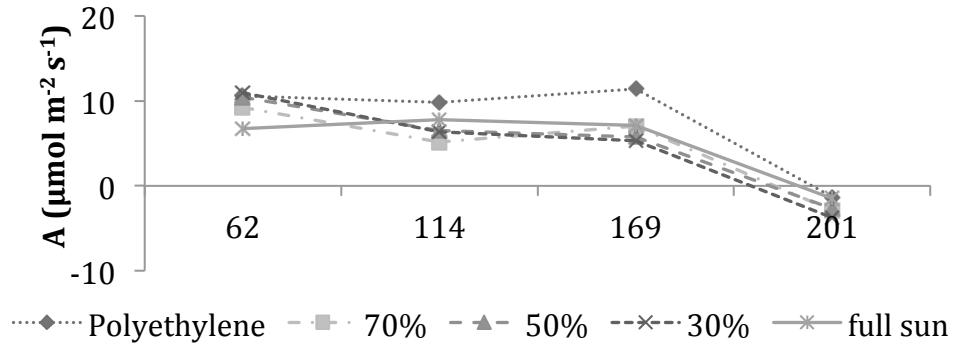
*Means in each column followed by the same letter are not significantly different (p<0.05)

Table 2. Fitted equations and determination coefficient for leaves and rhizomes biomass production of turmeric. São Manuel-SP, 2012-2013.

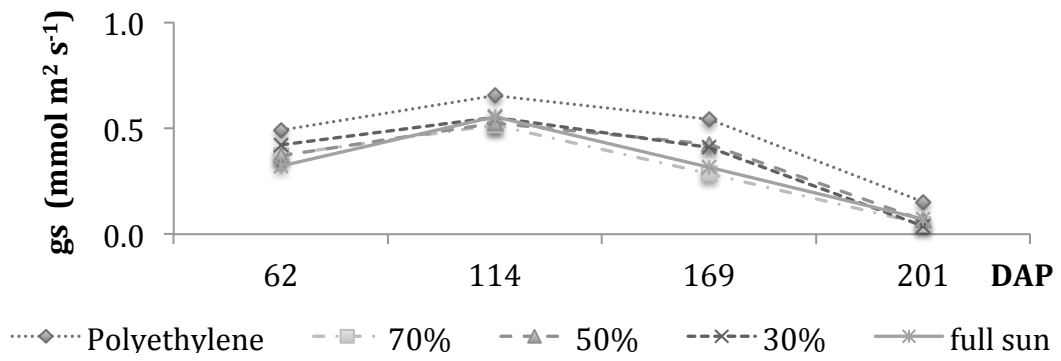
Lighting conditions	Equation	Determination coefficient
Leaves		
Polyethylene	$y = -0.005x^2 + 1.435x - 67.607$	$R^2 = 0.999$
70%	$y = -0.003x^2 + 0.762x - 34.362$	$R^2 = 0.993$
50%	$y = -0.003x^2 + 0.933x - 42.423$	$R^2 = 0.996$
30%	$y = -0.003x^2 + 0.903x - 40.384$	$R^2 = 0.946$
Fullsun	$y = -0.002x^2 + 0.651x - 28.637$	$R^2 = 0.999$
Rhizomes		
Polyethylene	$y = 0.923x - 60.864$	$R^2 = 0.977$
70%	$y = 0.540x - 34.973$	$R^2 = 0.948$
50%	$y = 0.705x - 47.884$	$R^2 = 0.942$
30%	$y = 0.641x - 43.221$	$R^2 = 0.944$
Fullsun	$y = 0.463x - 31.741$	$R^2 = 0.896$

Figures

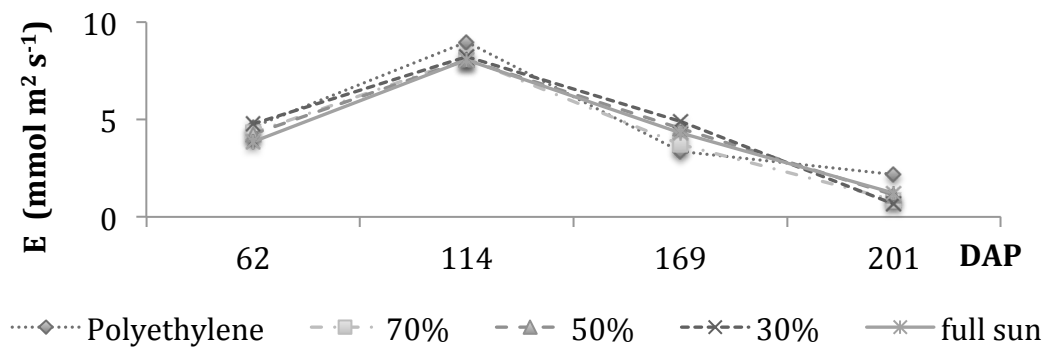
A



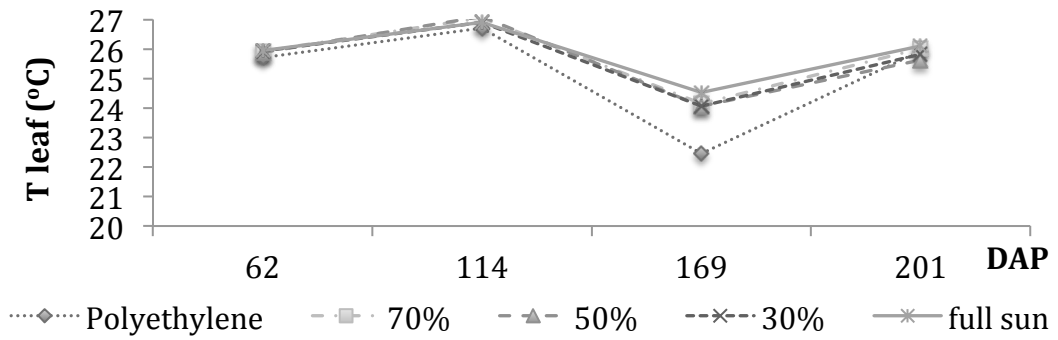
B



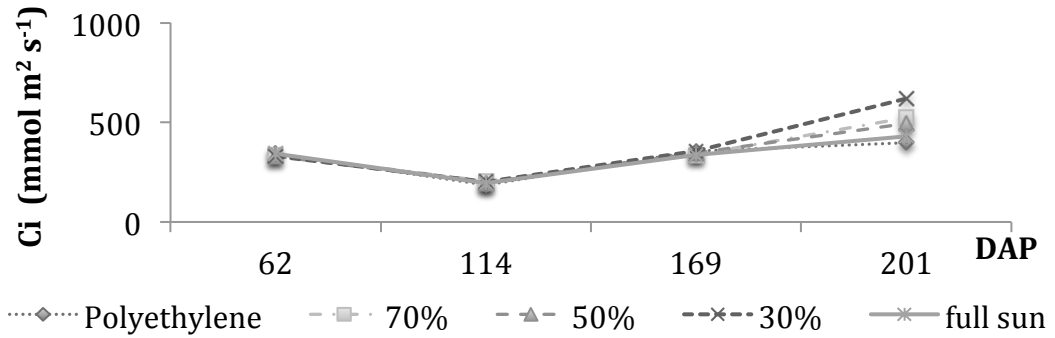
C



D



E



F

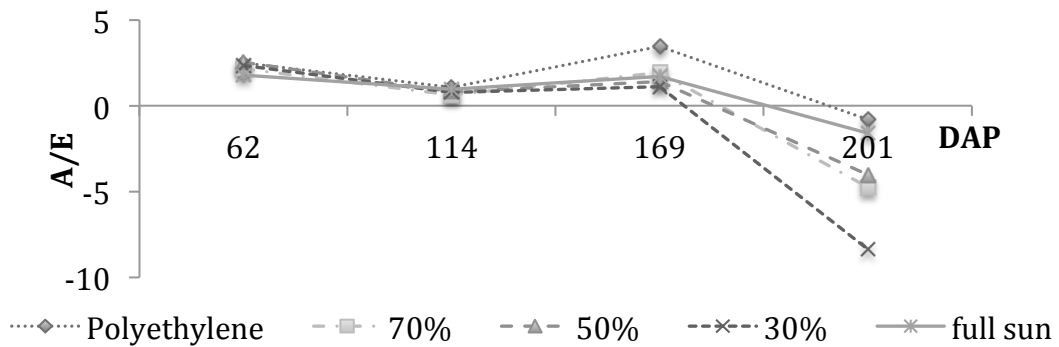


Fig. 1. Photosynthetic parameters measured at 62, 114, 169 and 201 days after planting (DAP) in different lighting conditions treatments in turmeric growth. São Manuel-SP, 2012-2013. (A- CO₂net assimilation (*A*), B-stomatal conductance (*g_s*); C- leaf transpiration (*E*) D- leaf temperature (*T_{leaf}*), E - internal CO₂ concentration (*C_i*) and F- water use efficiency (*A / E*).

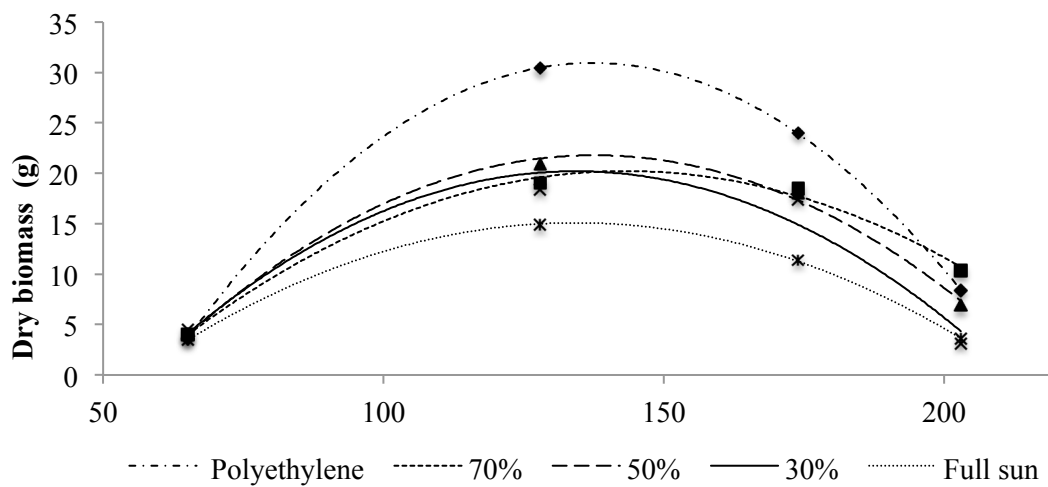


Fig. 2. Leaf biomass production of turmeric in different lighting conditions treatments and days after planting (65, 128, 174 and 203 DAP). São Manuel –SP. 2012-2013

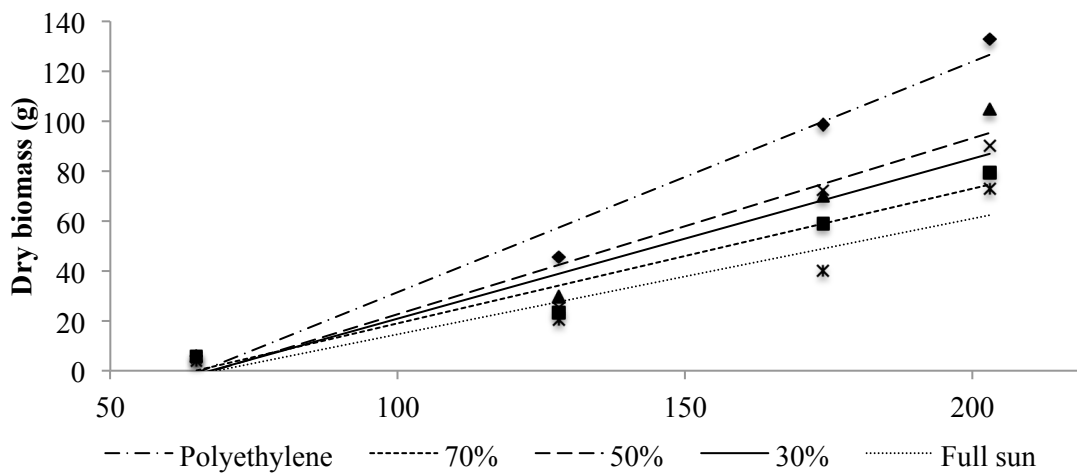


Fig 3. Turmeric rizome biomass production of turmeric in different lighting conditions treatments and days after planting (65, 128, 174 and 203 DAP). São Manuel –SP, 2012-2013

CAPÍTULO 2 — “Exclusão da radiação UV solar aumenta o rendimento de curcuminoides em *Curcuma longa* L.”

Exclusão da radiação UV solar aumenta o rendimento de curcuminoides em *Curcuma longa* L.

RESUMO

Neste estudo *Curcuma longa* L. foi cultivada em condições de campo, sob diferentes níveis de sombreamento e sob exclusão de raios ultravioleta (UV) solares, com o objetivo de se determinar os efeitos das condições de luz na fisiologia e produção de metabólitos secundários, em particular os curcuminoides. Para ampliar a caracterização bioquímica, as atividades da L-fenilalanina amônio-liase (PAL) e da peroxidase (POD), bem como o teor de fenóis totais (FT) e das poliaminas (PAs) [putrescina (Put), espermidina (Spd) e espermina (Spm)], foram considerados. Foi observado que o teor de curcumina (mg g^{-1}) permaneceu inalterado e a exclusão de UV levou a maior assimilação líquida de CO_2 , produção de biomassa e conseqüentemente a um notável aumento de 44,63 % no rendimento de curcuminoides totais, comparando com as plantas a pleno sol. Esse resultado mostra a importância do cultivo em ambiente protegido sob exclusão de UV para *C. longa*, proporcionando elevada produção de rizomas e alto rendimento de curcuminoides.

Palavras-chave: Cúrcuma; fotossíntese; biomassa; poliamina; POD; PAL

Exclusion of solar UV radiation increases the yield of curcuminoid in *Curcuma longa* L.

Abstract

In this study we grew *Curcuma longa* L. in field conditions at different shade levels and under exclusion of ultraviolet (UV), in order to determine the effects of light conditions in the physiology and production of secondary metabolites, in particular curcuminoids. To broaden the biochemical characterization, the activities of L-phenylalanine ammonia-lyase (PAL), peroxidase (POD) as well as total phenol content (TP) and polyamines (PAs) [putrescin (Put), spermidine (Spd) and spermine (Spm)], were considered. It was observed that the curcumin content remained unaltered and UV exclusion led to increased net CO₂ assimilation (*A*), biomass production and consequently a remarkable 44,63 % higher total curcuminoid yield was observed, comparing with full sun plants. This result shows the importance of protected environment cultivation under UV exclusion for *C. longa*, providing high rhizomes production and high curcuminoids yield.

Keywords: Turmeric; photosynthesis; biomass; polyamine; POD; PAL

1. Introdução

Curcuma longa L. (Zingiberaceae), também conhecida como cúrcuma, é uma monocotiledônea herbácea e perene amplamente cultivada nos trópicos. A espécie é uma importante fonte de curcuminoides, compreendendo a curcumina [(1E,6E)-1,7-bis-(4-hydroxy-3-methoxy-phenyl)-1,6-heptadien-3,5-dione; numero CAS: 458-37-7] e dois compostos relacionados, demetoxicurcumina (DMC) e bisdemetoxicurcumina (BDMC) (Kulkarni et al, 2012; Peyton et al., 2007). A curcumina tem atraído um interesse considerável nos últimos anos devido ao seu alto potencial medicinal. Tem sido amplamente estudada por seus efeitos anti-inflamatório, antiangiogênicos, antioxidante, cicatrizante de feridas e anti-câncer (Maheshwari et al., 2006), tem propriedades que inibem a sobrevivência e proliferação de células cancerosas, além de induzir a apoptose sem promover o desenvolvimento de efeitos secundários (Salem et al., 2014).

Há uma crescente demanda por cúrcuma nos EUA, Alemanha, França e Japão para uso como corantes naturais na indústria de alimentos e na indústria farmacêutica, fornecendo um mercado interessante para o desenvolvimento da cultura (Kandiannan et al., 2008). Notavelmente, a cúrcuma mostra variações significativas de produtividade, tanto entre variedades quanto em plantas cultivadas sob diferentes condições agro-climáticas. Portanto técnicas agrícolas que aumentem o conteúdo dos curcuminoides podem contribuir para a melhoria na produção da cúrcuma.

A influência de fatores de estresse ambiental sobre a composição química e o valor nutricional das plantas é um importante tópico de pesquisa. Um dos fatores ambientais mais responsivos ao estresse é a luz. A luz solar causa danos ao aparato fotossintético, principalmente ao fotossistema II (PSII), levando a fotoinibição e em última análise, suprime a assimilação fotossintética de CO₂ (A), o crescimento e a produtividade, ao passo que os comprimentos de onda do ultravioleta (UV) (280-400 nm) são muito mais fotoinibidores do que os comprimentos de onda da radiação fotossinteticamente ativa (PAR) (400-700 nm) (Takahashi et al., 2010).

Além disso, os níveis ambientais de radiação UV solar podem representar um estresse ambiental para as plantas, conduzindo a um aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), provocando efeitos protetores (Brosche e Strid, 2003), como a indução da biossíntese de compostos fenólicos que absorvem na faixa do UV-B (280-315 nm) (Jansen et al., 1998), bem como alterações na atividade das enzimas antioxidantes e no conteúdo de poliaminas (PAs) (Frohnmeier e Staiger, 2003).

PAs têm um papel regulador na estrutura e funcionamento do aparato fotossintético durante a fotoadaptação em diferentes ambientes de luz (Kotzabasis et al., 1999) e há evidências de que as PAs desempenham um papel fotoprotetor durante a exposição do aparato fotossintético a alta intensidade luminosa (Sfichi et al., 2004). No entanto, não existe consenso em relação aos efeitos da radiação UV-B sobre os níveis de poliaminas nas plantas (Jansen et al., 2008).

A indução na atividade das enzimas L-fenilalanina amônio-liase ([PAL], EC 4.3.1.5), que participam da via metabólica de compostos fenólicos, bem como a peroxidase ([POD], EC 1.11.1.7) ocorrem sob exposição a radiação UV-B, com o conseqüente acúmulo de ácidos fenólicos e flavonoides (Lavola et al., 2000). Além disso, os substratos iniciais na

síntese de curcuminoides em *C. longa* (cinnamoyl-CoA, p-coumaroyl-CoA or feruloil-CoA) são sintetizados a partir da fenilalanina por atividade da PAL (Katsuyama et al., 2009). De acordo com Dixit e Srivastava (2000a) a curcumina é sintetizada nas folhas e, em seguida, transloca-se para os rizomas. Porém Katsuyama et al. (2009) encontraram maiores níveis de expressão de genes que codificam enzimas envolvidas na síntese de curcumina [dicetide-CoA-sintase (DCS) e curcumina sintase (CURS)] no rizoma do que na folha, em concordância com as quantidades mais elevadas de curcuminoides nos rizomas do que nas folhas. Por isso podemos supor que alterações na qualidade da luz podem alterar o teor e o rendimento de curcuminoides em *C. longa*.

Alguns estudos prévios relataram a influência da intensidade de luz na produtividade e na qualidade da cúrcuma (Bhuiyan et al., 2012, Hossain et al., 2009, Padmapriya et al., 2007 e Srikrishnah e Sutharsan, 2015), indicando que *C. longa* tem boa produtividade de curcumina quando cultivada sob sombreamento. No entanto, nenhum estudo está disponível na literatura sobre a influência de exclusão UV sobre a qualidade das plantas de cúrcuma. Assim, no presente trabalho exploramos o efeito da intensidade da PAR e da exclusão de UV sobre a biossíntese de metabólitos secundários, em particular os curcuminoides. Para ampliar a caracterização bioquímica, foram consideradas as atividades da PAL e POD, bem como o teor de fenóis totais e PAs.

2. Material e Metodos

2.1 Local e delineamento experimental

O experimento foi conduzido na fazenda experimental da Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista - UNESP, Botucatu, São Paulo, localizado no município de São Manuel, São Paulo (22°46'0, 571 "S e 48°34'11, 32 "W, 744 m).

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com cinco condições de luz e cinco repetições de oito plantas cada. As condições de luz foram como se segue: exclusão de UV, pleno sol, 30 %, 50 % e 70 % de sombreamento.

O solo do local foi classificado como Latossolo Vermelho, fase arenosa (Camargo et al., 1987 e Santos et al., 2006). Na camada entre 0 e 0,20 m o solo exibiu as seguintes características químicas: Matéria orgânica (g dm⁻³) = 12; pH = 5,4; P (mg dm⁻³) = 204; K

(mmolc dm⁻³) = 2,5; Ca (mmolc dm⁻³) = 39; Mg (mmolc dm⁻³) = 11; CTC = 71 (mmolc dm⁻³); V = 76 %.

Rizomas semente de aproximadamente 12 cm de comprimento foram selecionados e homogeneizados. O plantio foi realizado em setembro, em leiras de 0,4 m de altura, espaçadas 0,5 m umas das outras, colocando-se cada propágulo a quatro centímetros de profundidade, em espaçamento de 0,5 m entre plantas.

Durante o desenvolvimento das plantas foram realizados tratos culturais necessários, como controle de plantas daninhas e reparos nas leiras de cultivo. As parcelas foram irrigadas diariamente, de acordo com a demanda de água registrada pelos tensiômetros instalados em cada parcela. A irrigação foi suspensa 15 dias antes da colheita, que foi realizada no final do ciclo da cultura, 203 dias após o plantio (DAP).

2.2 *Caracterização dos tratamentos*

As diferentes condições de luz foram obtidas pela utilização de ambientes protegidos, em uma estrutura do tipo túnel alto, com 3 m de largura, 1,70 m de altura e 22,5 m de comprimento, com revestimentos diferentes para o controle da exposição à luz. O revestimento aplicado para excluir as radiações UV foi um filme de polietileno anti-UV (150 µm) (Trifilme, Plastilux, Sapucaia do Sul, Rio Grande do Sul, Brazil), caracterizado pela exclusão de mais de 80 % da radiação UV-B. Os revestimentos utilizados para controlar os níveis de sombreamento foram telas de polietileno preto com 30 %, 50 % e 70 % de sombreamento (Plastilux, Sapucaia do Sul, Rio Grande do Sul, Brazil).

Um analisador de gás infravermelho (LI-6400, Li-Cor Inc. Lincoln, NE, EUA) foi utilizado para quantificar a radiação fotossinteticamente ativa (PAR) e a assimilação líquida de CO₂ (*A*) em cada condição de luz. As medições foram realizadas entre 09:00 e 11:00 horas, em dias sem nuvens, aos 62, 114, 169 e 201 DAP, com a radiação no interior da câmara padronizada para 1500 µmol m⁻².s⁻¹. A PAR medida foi utilizada para definir a quantidade de radiação presente em cada tratamento: pleno sol (100 % PAR = 1.200 µmol.m⁻².s⁻¹), 30 % de sombra (52,5 % PAR = 630 µmol.m⁻².s⁻¹), 50 % de sombra (41,66 % PAR = 500 µmol.m⁻².s⁻¹), 70 % de sombreamento (30 % PAR = 360 µmol.m⁻².s⁻¹) e exclusão UV (50,83 % PAR = 610 µmol.m⁻².s⁻¹).

2.3 *Preparação de amostras e determinação de biomassa*

Oito plantas foram colhidas, limpas e separadas em folhas, raízes e rizomas. Destas oito plantas, duas foram mantidas congeladas e seis foram secas. Duas plantas de cada repetição foram congeladas em nitrogênio líquido e mantidas em freezer a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Antes de cada análise, as amostras de rizomas e folhas foram moídas num moinho criogênico (Spex, 6750 freezer/mill, Metuchen, NJ, EUA). Estas amostras foram utilizadas para análise da atividade enzimática da L-fenilalanina amônio-liase (PAL), da peroxidase (POD), e para a determinação do conteúdo de fenóis totais (FT). Os teores das poliaminas (PAs) denominadas putrescine (Put), espermidina (Spd) e espermina (Spm) foram determinados para as mesmas amostras, após liofilização.

Seis plantas de cada repetição foram cortadas e secas em estufa de circulação forçada de ar, a $65 \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$ até que as amostras atingissem peso constante, para determinar a produção de biomassa. Os rizomas foram então moídos em moinho de facas formando um pó fino, homogeneizados e utilizados para medir o teor de curcuminoides por HPLC. O conteúdo de água nas folhas foi de aproximadamente $63,09\% \pm 0,65$ e nos rizomas foi $82,84 \pm 0,75\%$ para amostras frescas e liofilizadas.

2.4 *Análises bioquímicas*

2.4.1 *Reagentes Químicos*

Os reagentes Folin-Ciocalteu, carbonato de sódio, fosfato de potássio, metanol, tolueno e acetona foram obtidos da Vetec / Sigma (Sigma Aldrich, Brasil); Metanol de grau HPLC e acetonitrila de grau HPLC foram obtidos da Tedia (Tedia, Brasil); ácido gálico, ácido acético, ácido perclórico, prolina, fenilalanina, cloreto de dansil, β -mercaptoetanol, peróxido de hidrogênio, borato de sódio, 4-aminoantipirina, diclorofenol e padrões de curcuminoides e PAs, foram obtidos da Sigma (Sigma Aldrich, Brasil).

2.4.2 *Extração e estimativa da atividade da PAL (EC 4.3.1.5),*

A atividade da L-fenilalanina amônio-liase (PAL) foi determinada de acordo com Peixoto et al. (1999), utilizando tampão borato 0,1 M, pH 8,8 contendo 5 mM de β -mercaptoetanol para a extração. Os extratos foram adicionados ao tampão borato 0,2 M, pH 8,8 e os tubos de ensaio foram mantidas a 36 °C durante 5 min em banho de água, seguido pela adição de 0,1 M de fenilalanina e em seguida incubados a esta temperatura durante 60 min. A absorbância foi medida a 290 nm em um espectrofotômetro UV / Vis (Amersham-Pharmacia Biotech Ultrospec-2000) e os resultados foram expressos $\text{Abs min}^{-1} \text{ g}^{-1}$ de peso fresco.

2.4.3 *Extração e estimativa da atividade da POD (EC 1.11.1.7)*

A atividade da peroxidase (POD) foi avaliada como descrito por Lima et al. (1999), num tampão fosfato de potássio 0,2 M, pH 6,7 para a extração. Uma solução de H_2O_2 a 30 % foi adicionada ao extrato, seguido de 8 mM de 4-aminoantipirina e 14 mM de solução de diclorofenol. Os tubos foram mantidos num banho de água a 30 °C durante 5 min, e a absorbância das amostras foi medida a 505 nm em um espectrofotômetro UV / Vis (Amersham-Pharmacia Biotech Ultrospec-2000). Os resultados foram expressos em $\text{Abs min}^{-1} \text{ g}^{-1}$ de peso fresco.

2.4.4 *Extração e determinação do teor de fenóis totais (FT)*

O teor de FT foi determinada usando o reagente de Folin-Ciocalteu, com ácido gálico de grau analítico como o padrão, de acordo com os procedimentos descritos por Singleton e Rossi (1965). Amostras frescas foram extraídas em acetona a 50 %, o sobrenadante foi separado, adicionado a água deionizada e reagente de Folin-Ciocalteu. Após 5 minutos, o carbonato de sódio a 20 % foi adicionado à mistura. A solução da mistura foi deixada em repouso durante 60 minutos antes da leitura da absorbância, a 725 nm, que foi medida usando um espectrofotômetro UV / Vis (Amersham-Pharmacia Biotech Ultrospec-2000). As quantidades de FT foram calculadas usando uma curva de calibração de ácido

gálico. Os resultados foram expressos como equivalentes de ácido gálico (GAE) em mg g⁻¹ de material vegetal fresco.

2.4.5 *Determinação do conteúdo de poliaminas (PAs)*

As poliaminas putrescina (Put), espermidina (SPD) e espermina (SPM) foram extraídas e isoladas de acordo com o procedimento de Flores e Galston (1982) modificado por Lima et al. (2008). Resumidamente, as amostras de cúrcuma foram pesadas e homogeneizadas em ácido perclórico (5 % v / v) durante 1 hora a 4 °C. Após centrifugação (8000 xg, 20 min a 4 °C), 4,5 mol L⁻¹ de Na₂CO₃ e 18,5 mmol L⁻¹ de cloreto de dansil em acetona foi adicionado ao sobrenadante. As amostras foram incubadas no escuro durante 1 hora à temperatura ambiente. Em seguida, 0,87 mol L⁻¹ de prolina (99 %) foi adicionado e as amostras foram mantidas à temperatura ambiente durante 30 min. Tolueno foi usado para extrair as PAs dansiladas. Finalmente, alíquotas das amostras foram retiradas, sujeitas a secagem com N₂ e ressuspensas em 3 ml de acetonitrila de grau HPLC. A determinação do teor de PAs foi realizada de acordo Dadáková et al. (2009). As amostras (20 µL) foram injetadas num sistema UHPLC (Ultimate 3000 BioRS, Dionex-Thermo Fisher Scientific Inc., EUA) equipado com um detector de arranjo de diôdo fixado em 225-300 nm, executado a uma taxa de fluxo de 0,7 mL min⁻¹ utilizando uma coluna Ace 5 C18 (5 µm, 25 cm x 4,6 mm) (Advanced Chromatography Technologies, UK).

O esquema de gradiente de corrida cromatográfica realizada foi estabelecida com diferentes proporções de acetonitrila 100 % (A) e acetonitrila 50 % (B) como se segue: 0-4 min, 40 % de A + 60 % de B; 4-8 min, 60 % de A + 40 % de B; 8-12 min, 65 % de A + 35 % de B; 12-15 min, 85 % de A + 15 % de B; 15-20 min, 95 % de A + 5 % de B; 20-21 min, 95 % de A + 5 % de B; 21-22 min, 85 % de A + 15 % de B; 22 min, 75 % de A + 25 % B.

2.4.6 *Determinação do teor de curcuminoides*

A extração e determinação dos curcuminoides bisdemetoxicurcumina (BDMC), demetoxicurcumina (DMC) e curcumina foi realizada por HPLC, de acordo com o procedimento descrito por He et al. (1998), com algumas modificações.

O pó do rizoma da cúrcuma seco (0,1 g) foi submetido a um sistema de extração em refluxo com 20 ml de metanol durante 1 h; em seguida, 1 ml foi diluído com metanol, num frasco volumétrico (10 mL). Todas as amostras foram filtradas por meio de filtros de membrana de 0,22 µm antes das injeções. O volume de injeção foi de 20 µl (ciclo completo). Um sistema UHPLC (Ultimate 3000 BioRS, Dionex-Thermo Fisher Scientific Inc., EUA) equipado com um detector de arranjo de diôdo, equipado com uma coluna Ace 5 C18 (Advanced Chromatography Technologies, UK) (5 µm, 25 cm x 4,6 mm) foi utilizada a 48 °C para a análise de curcuminoides. O perfil do gradiente da fase móvel foi composta por água (0,25 % de ácido acético) (A), e acetonitrila (B), como se segue: 0-17 min, 40-60 % de B; 17-32 min, 60-85 % de B; 32-38 min, 85 % de B; 38-40 min, 85-40 % de B; 40-45 min, 40 % de B. O fluxo foi de 0,5 mL min⁻¹. Os picos dos curcuminoides foram identificados pelos tempos de retenção determinados nos os testes de injeção com os padrões (curcumina, BDMC e DMC).

O rendimento final de cada curcuminóide e o rendimento total de curcuminoides foram determinados pelo cálculo do teor (mg g⁻¹) e da biomassa acumulada (g) em cada parcela (Rendimento de curcuminoides (mg) = teor (mg g⁻¹) x biomassa (g)). O rendimento de curcuminoides foi expresso em mg e convertido em g.

2.5 *Análise Estatística*

Os resultados experimentais foram expressos como o valor médio (média ± desvio padrão). Os dados foram analisados por meio do programa estatístico Assistat (versão 7.7 beta (pt)). As diferenças significativas entre as amostras foram avaliadas por análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey (P <0,05).

3. Resultados e Discussão

3.1 Atividade da PAL e teor de fenóis totais (FT)

A atividade da PAL foi estudada em folhas e rizomas, sendo que a menor atividade da PAL foi encontrada nas folhas das plantas cultivadas sob 70 % de sombreamento e foi comparável à das plantas sob exclusão de UV. O teor de FT das folha seguiu a atividade de PAL, assim, o cultivo sob 70 % de sombreamento e sob exclusão de UV promoveram os valores mais baixos, tanto para FT como para a PAL (Tabela 1). Estes resultados estão de acordo com o papel de proteção dos compostos fenólicos contra a alta radiação solar ou os raios UV, uma vez que tanto a atividade da PAL quanto o teor de FT observados nas plantas a pleno sol foi maior.

Tabela 1. Atividades das enzimas PAL ($\text{Abs min}^{-1}\text{g}^{-1}$) e POD ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1}\text{g}^{-1}$) e conteúdo de fenóis totais (mg g^{-1}) (FT) em plantas de cúrcuma cultivadas sob diferentes condições de luz (exclusão de UV, 70 %, 50 %, 30 % de sombreamento e pleno sol).

	Anti-UV	70% sombra	50% sombra	30% sombra	Pleno sol
Folhas					
PAL	0.08±0.01 ^b	0.08±0.01 ^b	0.10±0.01 ^{ab}	0.13±0.03 ^a	0.13±0.02 ^a
POD	7.04±0.76 ^{ab}	7.18±1.26 ^{ab}	7.81±1.67 ^a	5.55±0.85 ^b	7.95±0.59 ^a
FT	12.24±1.31 ^c	12.76±0.37 ^{bc}	14.74±0.85 ^a	14.43±1.40 ^{ab}	14.67±0.37 ^a
Rizomas					
PAL	0.17±0.01 ^{ab}	0.13±0.02 ^b	0.15±0.04 ^b	0.14±0.02 ^b	0.20±0.02 ^a
POD	1.80±0.54 ^b	2.91±0.99 ^{ab}	2.86±0.72 ^{ab}	3.00±0.62 ^{ab}	3.71±0.83 ^a
FT	35.51±3.07 ^c	41.28±2.21 ^{ab}	36.63±1.96 ^{abc}	41.56±4.54 ^a	35.73±2.02 ^{bc}

Os dados são as médias de cinco repetições. Dados com a mesma letra na linha não são diferentes ao nível de 5 % de significância, com base no teste Tukey.

Em relação aos rizomas, os níveis de sombreamento não influenciaram a atividade enzimática da PAL (Tabela 1), mas em comparação com as plantas expostas a pleno sol, que apresentaram atividade mais elevada, a atividade da PAL sob exclusão de UV foi ligeiramente mais baixa. A dependência da atividade catalítica da PAL dos níveis de exposição a radiação UV foi anteriormente relatado por Lavola et al. (2000). A PAL tem um papel fundamental na biossíntese de polifenóis, por isso, um aumento da sua atividade enzimática deverá ser correlacionado com o teor de polifenóis mais elevado, como uma proteção contra o estresse induzido pela radiação UV (Cheng et al., 2001); no entanto, nos rizomas, não foi encontrada diferença do conteúdo de fenóis totais entre as plantas cultivadas sob exclusão de UV e sob pleno sol (Tabela 1).

3.2 Atividade da POD e teor de PAS

Entre todos os tratamentos, a ausência de radiação UV levou à menor atividade da POD nos rizomas, enquanto a mesma aumentou com a exposição à luz (Tabela 1). Resultados semelhantes foram encontrados nas folhas, com a maior atividade da POD estimada nas plantas cultivadas a pleno sol e 50 % de sombreamento, sendo que a atividade enzimática mais baixa foi encontrada nas plantas sob 30 % de sombreamento (Tabela 1). Resultados semelhantes foi relatado também em couve-nabiça (*Brassica napus* L.), a exclusão de radiação solar UV-B resultou na diminuição da atividade da enzima POD (Zhu e Yang, 2015).

Nesta pesquisa, observou-se que a atividade da POD é maior nas folhas e rizomas de plantas cultivadas sob altas intensidades de PAR, excluindo as folhas das plantas cultivadas em 30 % de sombreamento, e menor nas plantas protegidas da radiação UV.

A maior atividade da POD encontrada nas plantas cultivadas a pleno sol pode ser devido às enzimas oxidativas de PAs, como a diamina oxidase (DAO) e a poliamina oxidase (PAO), as quais podem ter aumentado a atividade durante algumas situações de stress induzidos pela luz, tal como descrito por Goyal e Asthir (2010). Esses pesquisadores relataram um aumento nas atividades PAO e DAO levando a um declínio nos níveis de PAs endógenos em genótipos de trigo sob estresse a alta temperatura. Os peróxidos são formados

durante o catabolismo de PAs, e para impedir a sua ação de oxidação, um aumento na atividade da POD em rizomas e folhas de cúrcuma pode ter ocorrido, uma vez que o peróxido de hidrogênio é o substrato da POD. Assim, alta atividade da POD nas plantas cultivadas sob pleno sol pode ser correlacionado com a capacidade antioxidante da enzima, assim, a atividade da POD foi provavelmente aumentada para combater os peróxidos de hidrogênio formados e outras EROs.

No presente estudo, foram observados níveis elevados de Put nos rizomas de *C. longa* cultivadas sob exclusão de UV e níveis elevados de Spm nas plantas expostas a pleno sol. Portanto a razão Put / Spm é elevada nas plantas sob exclusão de radiação UV e o inverso nas plantas a pleno sol (Figura 1).

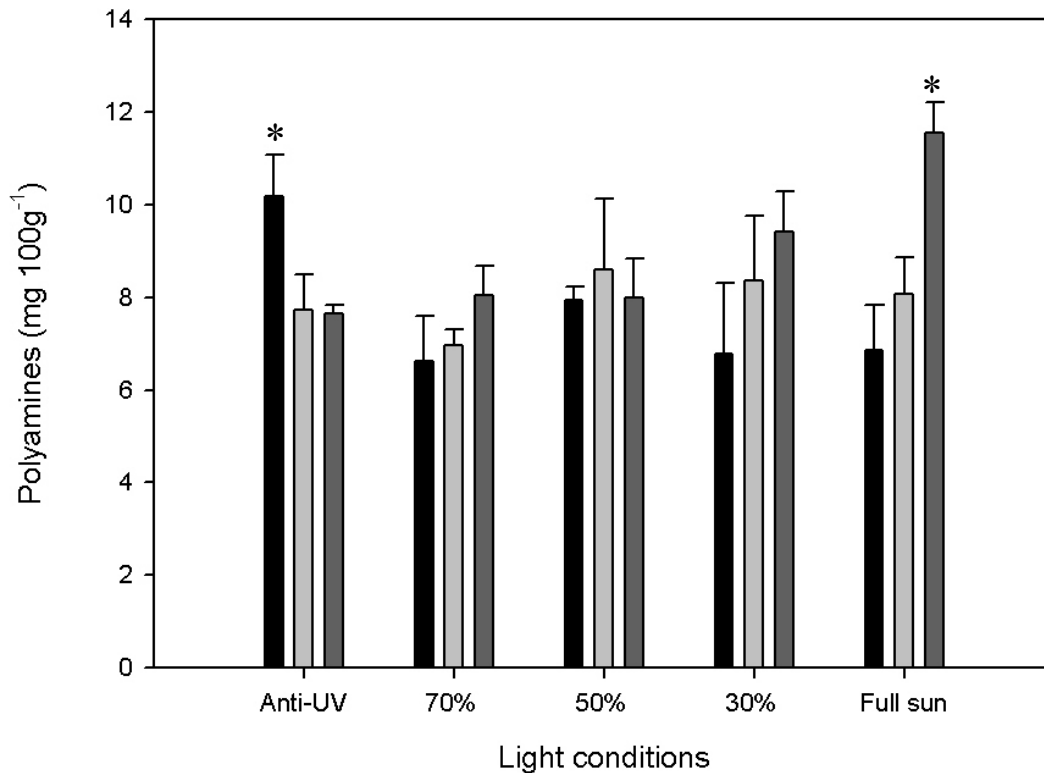


Figura 1. Teor de PAs (mg 100g⁻¹) nos rizomas da cúrcuma cultivadas sob diferentes condições de luz (exclusão de UV, 70 %, 50 %, 30 % de sombreamento e pleno sol). Barras pretas representam Put; barras cinza claro representam Spd e barras cinza escuro representam Spm.

De acordo com Sfichi et al. (2004), a radiação UV-B induz uma diminuição na Put associada aos tilacóides e um aumento de Spm. A redução da razão Put / Spm leva ao aumento da quantidade de luz capturada pelo complexo II, por centro de reação ativa, e conseqüentemente, a amplificação dos efeitos dos raios UV-B no aparato fotossintético, suprimindo a assimilação fotossintética de CO₂ e a produção de biomassa (Takahashi et al., 2010). Portanto, a supressão da *A* observada no presente estudo (Tabela 2), sugere que o teor de poliaminas nos rizomas tenha sido influenciados pelo conteúdo de poliaminas das folhas.

3.3 Biomassa e assimilação fotossintética de CO₂ (A)

A produção de biomassa diminuiu em função do aumento da intensidade da PAR, exceto para 70 % de sombreamento (Tabela 2). Estes resultados estão de acordo com Bhuiyan et al. (2012), que estudaram o crescimento e desenvolvimento de cúrcuma e gengibre a pleno sol e em quatro sistemas agroflorestais, com diferentes porcentagens de PAR (25-30 % a 70-80 %). De acordo com Bhuiyan e colegas, os parâmetros de crescimento e rendimento diminuíram gradualmente com o aumento da intensidade da luz.

No nosso estudo, encontramos a maior produção de biomassa em 50 % de sombreamento, resultado que também foi observado anteriormente em um estudo realizado por Srikrishnah e Sutharsan (2015), em que a área foliar, biomassa e produção foram significativamente maiores em condição de crescimento de 50 % de sombreamento. Concluímos que a diminuição dos parâmetros de crescimento sob 70 % de sombreamento pode ter sido relacionada à quantidade insuficiente de radiação solar recebida pelas plantas para alcançar ótima *A* e o menor crescimento em plantas cultivadas em campo aberto pode ser atribuído à destruição dos pigmentos fotossintéticos causada pelo excesso de luz solar (Tabela 2). Finalmente, as plantas crescidas sob proteção de raios UV destacaram-se em termos de *A* e produção de biomassa dos rizomas, levando a uma produção 21 % superior em relação ao melhor resultado dos níveis de sombreamento (50 % de sombra).

Tabela 2. Assimilação líquida de CO₂ (*A*) (μmol m² s⁻¹) e biomassa de rizoma (g) de cúrcuma cultivada sob diferentes condições de luz (exclusão de UV, 70 %, 50 %, 30 % de sombreamento e pleno sol).

Tratamentos	<i>A</i>	Biomassa
Anti-UV	10.62±0.80	797.03±174.04 ^a
70% sombra	7.13±2.05	476.83±32.03 ^{cd}
50% sombra	7.57±2.51	628.42±13.07 ^b
30% sombra	7.55±3.03	540.42±17.37 ^{bc}
Pleno sol	7.24±0.52	436.14±46.68 ^d

Os dados são as médias de cinco repetições. Dados com a mesma letra na coluna não são diferentes ao nível de 5 % de significância, com base no teste Tukey.

3.4 Teor de curcuminoides

A individualização das condições de exposição à luz para a obtenção do maior teor de curcumina (mg g⁻¹), bem como para a maior produção de biomassa, representa uma tarefa interessante, pois o rendimento da curcumina (g) depende de ambos aspectos. No presente estudo, a exclusão de UV em *C. longa* não afetou o teor de curcumina e DMC no rizoma, mostrando resultados semelhantes quando as plantas foram cultivadas a pleno sol e em diferentes níveis de sombreamento. Um elevado teor de BDMC foi encontrado nos rizomas das plantas sob 50 % de sombreamento e o nível mais baixo foi encontrado nas plantas protegidas do UV (Tabela 3).

Alguns estudos indicam que a cúrcuma tem alto teor de curcumina e produção de biomassa sob sombreamento. Padmapriya et al. (2007) descobriu que as plantas cultivadas sob sombreamento de 25 a 30 % em Coimbatore, Índia, mostraram um aumento tanto do

conteúdo total de fenóis quanto de curcumina, além de ter registrado a maior produção de biomassa.

Em Okinawa, a biomassa e o rendimento dependem significativamente de sombreamento, com uma produção máxima sob 27 % de sombreamento, sendo que o conteúdo de curcumina aumentou quando o sombreamento foi entre 41 % e 27 %, mas diminuiu quando as plantas foram cultivadas em 52 % de sombreamento, exibindo um efeito antagonista sobre o acúmulo de curcumina (Hossain et al., 2009). Por conseguinte, a luz necessária para aumentar o rendimento e a qualidade da cúrcuma varia com o nível de irradiância em cada local, bem como com as variedades e as condições agro-climáticas.

Tabela 3: Teor de curcumina, demetoxicurcumina (DMC) e bisdemetoxicurcumina (BDMC) (mg g^{-1}) em rizomas de cúrcuma cultivadas sob diferentes condições de luz (exclusão de UV, 70 %, 50 %, 30 % de sombreamento e pleno sol).

Tratamentos	DMC	BDMC	Curcumina
Anti-UV	4.55±0.26 ^a	6.55±0.12 ^b	10.66±0.03 ^a
70% sombra	5.50±0.83 ^a	8.13±0.38 ^{ab}	9.84±0.09 ^a
50% sombra	5.70±0.53 ^a	8.64±0.75 ^a	10.29±0.56 ^a
30% sombra	4.63±0.74 ^a	7.24±1.45 ^{ab}	8.95±1.34 ^a
Pleno sol	4.82±0.64 ^a	7.52±0.39 ^{ab}	9.68±0.56 ^a

Os dados são as médias de cinco repetições. Dados com a mesma letra entre cada coluna não são diferentes ao nível de 5 % de significância, com base no teste Tukey.

De acordo com Dixit e Srivastava (2000a, 2000b) o conteúdo de curcuminoides depende principalmente da capacidade fotossintética das folhas, em seguida, da translocação e acúmulo dos fotoassimilados nos rizomas. Portanto, a quantidade de fotoassimilados produzidos pelas folhas e a fração translocada para o rizoma irá influenciar significativamente o tamanho do rizoma o teor e rendimento de curcuminoides. Sendo que a fração de fotoassimilados acumulada nos rizomas e a capacidade de biossíntese de

curcuminoides nas folhas e rizomas (Katsuyama et al., 2009) são os fatores que controlam o acúmulo destes metabolitos secundários.

Embora os níveis de sombreamento e a exclusão do UV não tenham alterado o teor de curcumina (Tabela 3), um notável aumento de 44,63 % de rendimento de curcuminoides (Figura 2) foi observado, comparando com plantas pleno sol.

Estes resultados representam uma correlação entre diferentes processos, tais como a biossíntese de curcumina nos rizomas, o alto desempenho fotossintético e o maior crescimento dos rizomas das plantas cultivadas sob exclusão de UV, destacando a importância da proteção UV no cultivo da cúrcuma.

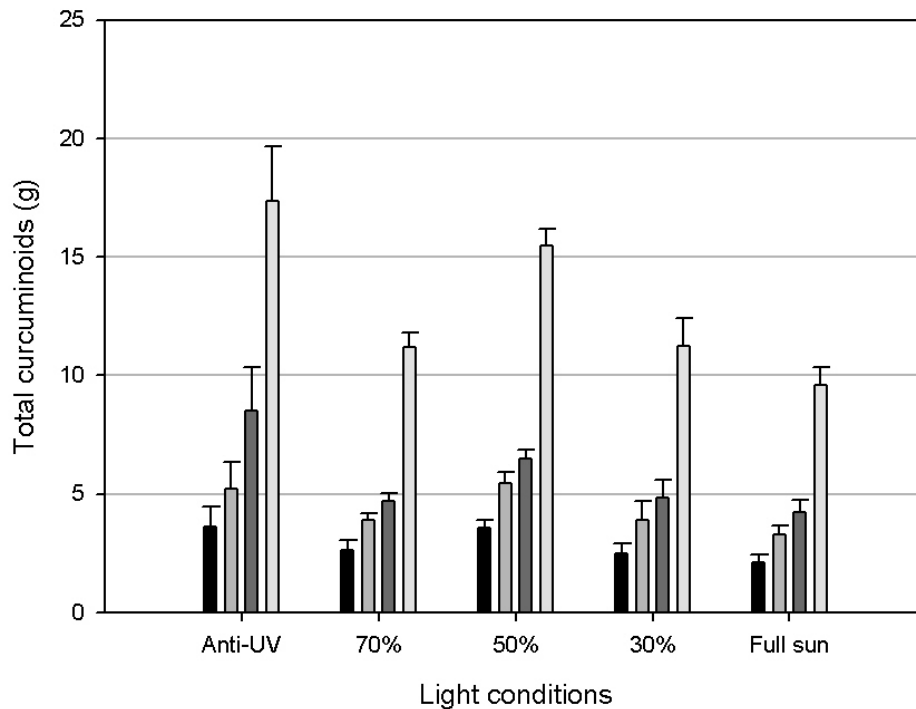


Figura 2. Rendimento (g) de demetoxicurcumina (DMC), bisdemetoxicurcumina (BDMC), curcumina e curcuminoides totais de rizomas de cúrcuma cultivadas sob diferentes condições de luz (exclusão de UV, 70 %, 50 %, 30 % de sombreamento e pleno sol). As barras pretas representam DMC, barras cinza representam BDMC, barras cinza escuro representam curcumina e barras cinza claro representam curcuminoides totais.

4. Conclusão

Os efeitos da exposição à luz solar e a exclusão da radiação UV alteram a fisiologia e a produção dos metabolitos secundários nas folhas e rizomas de *C. longa*.

O teor de FT, e atividade de POD e PAL aumentaram com a exposição à luz e diminuíram sob exclusão do UV. O conteúdo de Spm é maior nos rizomas de plantas expostas ao sol, e os níveis de Put são superiores sob exclusão de UV. O teor de curcumina e DMC (mg g^{-1}) não foram afetados por diferentes níveis de exposição à luz e pela exclusão do UV, o qual proporcionou o menor teor de BDMC. Notavelmente, as plantas protegidas do UV apresentaram aumento na fotossíntese e, conseqüentemente, na produção de biomassa, levando ao aumento de 44,63 % no rendimento de curcuminoides totais, comparando com plantas a pleno sol. Com base nestes resultados, conclui-se que o cultivo sob luz solar plena é estressante para *C. longa* e a exclusão do UV fornecida pela película de polietileno anti-UV durante o crescimento das plantas conduziu a melhorias no rendimento de curcuminoides totais.

Agradecimentos

Os autores agradecem o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES - Brasil; 99999,010436 / 2014-06), Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq - Brasil; 478372 / 2013-2 e 306151 / 2012-0) e Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP - Brasil; 2013 / 05644-3).

5. Referências

ANDREOTTI, C.; COSTA, G.; TREUTTER, D. Composition of phenolic compounds in pear leaves as affected by genetics, ontogenesis and the environment. **Scientia Horticulturae**, v. 109, p. 130–137, 2006.

ASGHARI, G.; MOSTAJERAN, A.; SHEBLI, M. Curcuminoid and essential oil components of turmeric at different stages of growth cultivated in Iran. **Research in Pharmaceutical**

Sciences, v. 4, n. 1, p. 55–61, 2009.

BAMBIRRA, M. L. A.; JUNQUEIRA, R. G.; GLÓRIA, M. B. A. Influence of post harvest processing conditions on yield and quality of ground turmeric (*Curcuma longa* L.). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 45, n. 4, p. 423–429, dez. 2002.

BERBERICH, T.; SAGOR, G. H. M.; KUSANO, T. Polyamines in Plant Stress Response. In: KUSANO, T.; SUZUKI, H. (Eds.). . **Polyamines**. [s.l.] Springer Japan, 2015. p. 155–168.

BERGQUIST, S. A. et al. Flavonoids in Baby Spinach (*Spinacia oleracea* L .): Changes during Plant Growth and Storage. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 53, p. 9459–9464, 2005.

BHUIYAN, M. M. R. et al. Impact of multistoreyed agro-forestry systems on growth and yield of turmeric and ginger at Mymensingh, Bangladesh. **eSci Journal of Crop Production**, v. 1, n. 1, p. 19–23, 15 dez. 2012.

BORSARI, M. et al. Curcuminoids as potential new iron-chelating agents: spectroscopic, polarographic and potentiometric study on their Fe(III) complexing ability. **Inorganica Chimica Acta**, v. 328, n. 1, p. 61–68, jan. 2002.

CAMARGO, M. N.; KLAMT, E.; KAUFFMAN, J. H. **Classificação de solos usada em levantamentos pedológicos no Brasil**. Campinas: EMBRAPA-SNLCS, 1987.

CHENG, S. et al. Molecular identification of phenylalanine ammonia-lyase as a substrate of a specific constitutively active Arabidopsis CDPK expressed in maize protoplasts. **FEBS Letters**, v. 503, n. 2-3, p. 185–188, 17 ago. 2001.

COORAY, N. et al. Effect of maturity on some chemical constituents of turmeric (*Curcuma longa* L.). **J. Natn. Sci. Coun. Sri Lanka**, v. 16, n. 1, p. 39–51, 1988.

DÍAZ, B. M. et al. Impact of ultraviolet-blocking plastic films on insect vectors of virus

- diseases infecting crisp lettuce. **HortScience**, v. 41, p. 711–716, 2006.
- DIXIT, D.; SRIVASTAVA, N. K. Partitioning of ¹⁴C-photosynthate of leaves in roots, rhizome, and in essential oil and curcumin in turmeric (*Curcuma longa* L.). **Photosynthetica**, v. 38, p. 275–280, 2000a.
- DIXIT, D.; SRIVASTAVA, N. K. Distribution of photosynthetically fixed ¹⁴CO₂ into curcumin and essential oil in relation to primary metabolites in developing turmeric (*Curcuma longa*) leaves. **Plant Science**, v. 152, p. 165–171, 2000b.
- ESATBEYOGLU, T. et al. Curcumin - vom Molekül zur biologischen Wirkung. **Angewandte Chemie**, v. 124, n. 22, p. 5402–5427, 29 maio 2012.
- FROHNMEYER, H.; STAIGER, D. Ultraviolet-B radiation-mediated responses in plants. Balancing damage and protection. **Plant physiology**, v. 133, n. 4, p. 1420–8, 1 dez. 2003.
- GARCÍA-MACÍAS, P. et al. Changes in the flavonoid and phenolic acid contents and antioxidant activity of red leaf lettuce (Lollo Rosso) due to cultivation under plastic films varying in ultraviolet transparency. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 10168–10172, 2007.
- GHASEMZADEH, A. et al. Effect of Different Light Intensities on Total Phenolics and Flavonoids Synthesis and Anti-oxidant Activities in Young Ginger Varieties (*Zingiber officinale* Roscoe). **International Journal of Molecular Sciences**, v. 11, p. 3885–3897, 2010.
- GILL, S. S.; TUTEJA, N. Polyamines and abiotic stress tolerance in plants. **Plant signaling & behavior**, v. 5, n. 1, p. 26–33, jan. 2010.
- GUPTA, S. C.; KISMALI, G.; AGGARWAL, B. B. Curcumin, a component of turmeric: from farm to pharmacy. **BioFactors (Oxford, England)**, v. 39, n. 1, p. 2–13, jan. 2013.

- HACKETT, W. P. Differential expression and functional significance of anthocyanins in relation to phasic development in *Hedera helix* L. **Advances in Botanical Research**, v. 37, p. 95–102, 2002.
- HERTWIG, I. VON. Curcuma. In: **Plantas medicinais e aromáticas**. São Paulo: Icone, 1986. p. 254–65.
- HORÁK, D. et al. Preparation and properties of magnetic nano- and microsized particles for biological and environmental separations. **Journal of separation science**, v. 30, n. 11, p. 1751–72, jul. 2007.
- HOSSAIN, M. A. et al. Effects of Relative Light Intensity on the Growth, Yield and Curcumin Content of Turmeric (*Curcuma longa* L.) in Okinawa, Japan. **Plant Production Science**, v. 12, p. 29–36, 2009.
- HOSSAIN, M. A. Effects of Harvest Time on Shoot Biomass and Yield of Turmeric (*Curcuma longa* L.) in Okinawa, Japan. v. 13, n. June 2009, 2010.
- HOSSAIN, M. A.; ISHIMINE, Y. Growth, Yield and Quality of Turmeric (*Curcuma longa* L.) Cultivated on Dark-red Soil, Gray Soil and Red Soil in Okinawa, Japan. **Plant Production Science**, v. 8, n. 4, p. 482–486, 22 dez. 2005.
- JANSEN, M. A. .; GABA, V.; GREENBERG, B. M. Higher plants and UV-B radiation: balancing damage, repair and acclimation. **Trends in Plant Science**, v. 3, n. 4, p. 131–135, 4 abr. 1998.
- JANSEN, M. A. K. et al. Plant stress and human health: Do human consumers benefit from UV-B acclimated crops? **Plant Science**, v. 175, n. 4, p. 449–458, out. 2008.
- JAYAPRAKASHA, G. K.; JAGAN MOHAN RAO, L.; SAKARIAH, K. K. Chemistry and biological activities of *C. longa*. **Trends in Food Science & Technology**, v. 16, n. 12, p.

533–548, dez. 2005.

KANDIANNAN, K.; CHEMPAKAM, B.; KRISHNAMURTHY, K. Turmeric. In: PARTHASARATHY, V. A.; KANDIANNAN, K.; SRINIVASAN, V. (Eds.). . **Organic Spices**. 1. ed. [s.l.] New India Publishing, 2008. p. 387–438.

KATSUYAMA, Y. et al. Curcuminoid biosynthesis by two type III polyketide synthases in the herb *Curcuma longa*. **The Journal of biological chemistry**, v. 284, n. 17, p. 11160–70, 24 abr. 2009.

KITTS, D.; WEILER, K. Bioactive Proteins and Peptides from Food Sources. Applications of Bioprocesses used in Isolation and Recovery. **Current Pharmaceutical Design**, v. 9, n. 16, p. 1309–1323, 1 jun. 2003.

KOLB, C. A. et al. UV screening by phenolics in berries of grapevine (*Vitis vinifera*). **Functional Plant Biology**, v. 30, p. 1177–1186, 2003.

KRIZEK, D. T. et al. Inhibitory effects of ambient levels of solar UV-A and UV-B radiation of growth of cv. New Red Fire lettuce. **Physiologia Plantarum Plant.**, v. 103, n. 1, p. 1–7, maio 1998.

KRUMBEIN, ANGELIKA, SAEGER-FINK HEIDI, S. I. Changes in quercetin and kaempferol concentrations during broccoli head ontogeny in three broccoli cultivars. **Journal of applied botany and Food Quality**, v. 81, p. 136–139, 2007.

KULKARNI, S. J. et al. Extraction and purification of curcuminoids from Turmeric (*Curcuma longa* L.). p. 81–84, 2012.

KUMAR, B.; GILL, B. S. Effect of method of planting and harvesting time on growth, yield and quality of turmeric (*Curcuma longa* L.). **Journal of Spices and Aromatic Crops**, v. 18, n. 1, p. 22–27, 2009.

- LARCHER, W. **Ecofisiologia vegetal**. São Carlos - SP: Rima, 2000.
- LAVOLA, A. et al. Allocation of carbon to growth and secondary metabolites in birch seedlings under UV-B radiation and CO₂ exposure. **Physiologia Plantarum**, v. 109, n. 3, p. 260–267, 25 jul. 2000.
- LI, S. et al. Chemical Composition and Product Quality Control of Turmeric (*Curcuma longa* L .). **Pharmaceutical Crops**, v. 2, p. 28–54, 2011.
- LORENZI, H.; MATOS, F. DE A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. 2. ed. Nova Odessa: Plantarum, 2002.
- LUTHRIA, D. L.; MUKHOPADHYAY, S.; KRIZEK, D. T. Content of total phenolics and phenolic acids in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) fruits as influenced by cultivar and solar UV radiation. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 19, p. 771–777, 2006.
- LÜTZ, C. et al. Simulated solar irradiation with enhanced UV-B adjust plastid- and thylakoid-associated polyamine changes for UV-B protection. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1710, p. 24–33, 15 nov. 2005.
- MACKAY, M. E. General Strategies for Nanoparticle Dispersion. **Science**, v. 311, n. 5768, p. 1740–1743, 24 mar. 2006.
- MAGRO, M. et al. **Maghemite nanoparticles and method for preparing thereof**, 17 mar. 2012a. Disponível em: <<https://www.google.com/patents/US8980218>>. Acesso em: 19 nov. 2015
- MAGRO, M. et al. Charge binding of rhodamine derivative to OH- stabilized nanomaghemite: universal nanocarrier for construction of magnetofluorescent biosensors. **Acta biomaterialia**, v. 8, n. 6, p. 2068–76, jul. 2012b.
- MAGRO, M. et al. A magnetically drivable nanovehicle for curcumin with antioxidant

capacity and MRI relaxation properties. **Chemistry (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)**, v. 20, n. 37, p. 11913–20, 8 set. 2014.

MAGRO, M. et al. Magnetic purification of curcumin from *Curcuma longa* rhizome by novel naked maghemite nanoparticles. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 63, n. 3, p. 912–20, 28 jan. 2015.

MAHESHWARI, R. K. et al. Multiple biological activities of curcumin: a short review. **Life sciences**, v. 78, n. 18, p. 2081–7, 27 mar. 2006.

MALLICK, N.; MOHN, F. H. Reactive oxygen species: response of algal cells. **Journal of Plant Physiology**, v. 157, n. 2, p. 183–193, ago. 2000.

MANHAS, S. S.; GILL, B. S. Effect of different cultural practices on production of turmeric (*Curcuma longa* L.) in Punjab. **Journal of Spices and Aromatic Crops**, v. 21, n. 1, p. 53–58, 2012.

MARCHESE, J. A. et al. Carbon isotope composition as a tool to control the quality of herbs and medicinal plants. **Photosynthetica**, v. 44, p. 155–159, 2006.

MARÍN, A. et al. Characterization and quantitation of antioxidant constituents of sweet pepper (*Capsicum annuum* L.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 3861–3869, 2004.

MIERZIAK, J.; KOSTYN, K.; KULMA, A. Flavonoids as Important Molecules of Plant Interactions with the Environment. **Molecules**, v. 19, p. 16240–16265, jan. 2014.

NAIR, K. P. P. The Botany of Turmeric. In: **The Agronomy and Economy of Turmeric and Ginger: the invaluable medicinal spice crops**. Amsterdam: Elsevier, 2013. p. 7–32.

PADMAPRIYA, S.; CHEZHIAN, N.; SATHIYAMURTHY, V. A. Effect of shade and integrated nutrient management on biochemical constituents of turmeric (*Curcuma longa* L.).

Journal of Horticultural Sciences, v. 2, n. 2, p. 123–129, 2007.

POTHITIRAT, W.; GRITSANAPAN, W. Variability of curcuminoids: anti-oxidative components in ethanolic turmeric extract determined by UV and HPLC methods. **Acta Horticulturae**, v. 786, p. 175–184, 2008.

PRASAD, S.; AGGARWAL, B. B. Turmeric - the Golden Spice. In: BENZIE, I.; WACHTEL-GALOR, S. (Eds.). . **Herbal Medicine: Biomolecular and Clinical Aspects**. 2. ed. Boca Raton (FL): CRC Press, 2011.

SANTOS, H. G. et al. **Sistema brasileiro de classificação de solos**. 2. ed. Rio de Janeiro: Embrapa solos, 2006.

SCANDALIOS, J. G. Oxidative stress: Molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 38, p. 995–1014, 2005.

SFICHI, L.; LOANNIDIS, N.; KOTZABASIS, K. Thylakoid-associated Polyamines Adjust the UV-B Sensitivity of the Photosynthetic Apparatus by Means of Light-harvesting Complex II Changes¶. **Photochemistry and Photobiology**, v. 80, n. 3, p. 499–506, 30 abr. 2004.

SINGH, S.; PANDA, M. K.; NAYAK, S. Evaluation of genetic diversity in turmeric (*Curcuma longa* L.) using RAPD and ISSR markers. **Industrial Crops and Products**, v. 37, p. 284–291, maio 2012.

SINIGAGLIA, G. et al. Catalytically active bovine serum amine oxidase bound to fluorescent and magnetically drivable nanoparticles. **International journal of nanomedicine**, v. 7, p. 2249–59, jan. 2012.

SMITH, J.; BURRITT, D.; BANNISTER, P. Ultraviolet-B radiation leads to a reduction in

free polyamines in *Phaseolus vulgaris* L. **Plant Growth Regulation**, v. 35, n. 3, p. 289–294, 2001.

SOLOVCHENKO, A.; SCHMITZ-EIBERGER, M. Significance of skin flavonoids for UV-B-protection in apple fruits. **Journal of Experimental Botany**, v. 54, n. 389, p. 1977–1984, 2003.

SRIKRISHNAH, S.; SUTHARSAN, S. Effect of Different Shade Levels on Growth and Tuber Yield of Turmeric (*Curcuma longa* L.) In the Batticaloa District of Sri Lanka. **American-Eurasian J. Agric. & Environ. Sci.**, v. 15, n. 5, p. 813–816, 2015.

SRIVASTAVA, N. K.; SHARMA, S.; MISRA, A. Influence of Zn on allocation of leaf-assimilated $^{14}\text{CO}_2$ into primary metabolites in relation to production of essential oil and curcumin in Turmeric (*Curcuma longa* L.). **World Journal of Agricultural Sciences**, v. 2, p. 201–207, 2006.

SURESH, D.; MANJUNATHA, H.; SRINIVASAN, K. Effect of heat processing of spices on the concentrations of their bioactive principles: Turmeric (*Curcuma longa*), red pepper (*Capsicum annuum*) and black pepper (*Piper nigrum*). **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 20, n. 3-4, p. 346–351, maio 2007.

TAKAHASHI, S. et al. The solar action spectrum of photosystem II damage. **Plant physiology**, v. 153, n. 3, p. 988–993, 1 jul. 2010.

TREUTTER, D. Managing Phenol Contents in Crop Plants by Phytochemical Farming and Breeding — Visions and Constraints. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 11, p. 807–857, 2010.

TROPICOS. **Tropicos.org - Curcuma longa L.** Disponível em: <<http://www.tropicos.org/Name/34500029>>. Acesso em: 6 jan. 2014.

TSORMPATSIDIS, E. et al. UV irradiance as a major influence on growth, development and secondary products of commercial importance in Lollo Rosso lettuce “Revolution” grown under polyethylene films. **Environmental and Experimental Botany**, v. 63, p. 232–239, 2008.

TURKOVÁ, J. **Affinity Chromatography**. 1. ed. Amsterdam, The Netherlands: Elsevier Scientific Publishing Company, 1978.

VALLEJO, F.; GARCÍA-VIGUERA, C.; TOMÁS-BARBERÁN, F. A. Changes in broccoli (*Brassica oleracea* L. Var. *italica*) health-promoting compounds with inflorescence development. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 51, p. 3776–3782, 2003.

VENERANDO, R. et al. Magnetic Nanoparticles with Covalently Bound Self-Assembled Protein Corona for Advanced Biomedical Applications. **The Journal of Physical Chemistry C**, v. 117, n. 39, p. 20320–20331, 3 out. 2013.

WANG, Y.; HU, W.; WANG, M. HPLC determination of three curcuminoid constituents in rhizoma *Curcumae*. **Acta Pharmaceutica Sinica**, 1999.

CAPÍTULO 3 - “Otimização da produção e da purificação magnética de curcuminoides de *Curcuma longa* L.”

Otimização da produção e da purificação magnética de curcuminoides de *Curcuma longa* L.

RESUMO

O teor de curcuminoides em *Curcuma longa* L. foi estudado em função da maturidade da planta e da exclusão da radiação UV solar, bem como de níveis de sombreamento, compreendidos entre pleno sol e 70 % de sombreamento. O período de colheita ideal para a obtenção do maior teor de curcuminoides foi aos 65 dias após o plantio (DAP) e a condição de luminosidade foi sob 70 % de sombreamento. Neste período a produção de biomassa foi notavelmente menor, fator importante para a redução dos custos relacionados com o transporte de matéria-prima, geração de resíduos e uso de solventes para extração de curcuminoides. Além disso, um procedimento para a purificação magnética de curcuminoides usando novas nanopartículas de maghemita, chamadas Surface Active Maghemite Nanoparticles (SAMNs), foi otimizado. O rendimento alcançado foi 69,7 mg de curcuminoides g⁻¹ de pó de rizoma de *C. longa*, um aumento correspondente a 17,6 vezes, em relação ao protocolo anteriormente relatado, levando à recuperação de > 98 % de curcuminoides e oferecendo possibilidades reais para a produção industrial competitiva de curcuminoides.

Palavras-Chave: açafrão, intensidade de luz, exclusão de UV, curcumina, biomassa, nanopartículas

Optimized production and magnetic purification of curcuminoids from *Curcuma longa*

L.

Abstract

Curcuminoid content in *Curcuma longa* L. was studied as a function of plant maturity and of solar UV exclusion, as well as of standard shading in the range comprised between full sun and 70 % shading. The best conditions for obtaining the highest curcuminoid content were 65 days after planting and 70 % shading, leading to a remarkable reduction of biomass demand and providing useful information for the reduction of costs related to raw material transport, waste generation and solvent for curcuminoid extraction. Moreover, Furthermore, a procedure for curcuminoids purification using novel maghemite nanoparticles, named Surface Active Maghemite Nanoparticles (SAMNs), was optimized. The yield achieved was 69.7 mg curcuminoids g⁻¹ of *C. longa* powder rhizome, corresponding increase to 17.6 times, compared to the previously reported protocol, leading to the recovery of > 98 % of curcuminoids and offering opportunities real for competitive industrial production curcuminoids.

Keywords: Turmeric, light intensity, UV exclusion, curcumin, biomass, nanoparticles
Chemical compounds studied in this article

Curcumin (PubChem CID: 2889); Demethoxycurcumin (PubChem CID: 5469424);
Bisdemethoxycurcumin (PubChem CID: 5315472).

1. Introdução

Curcuma longa L. (Zingiberaceae) também conhecida como curcuma é a fonte mais importante de curcuminoides, compreendendo a curcumina e dois compostos relacionados, demetoxicurcumina (DMC) e bisdemetoxicurcumina (BDMC) (Kulkarni et al., 2012). Hoje em dia, a curcumina é usada como suplemento alimentar, em vários países e a base molecular para a sua utilização farmacêutica foi já delineada para uma ampla gama de doenças (Gupta; Kismali; Aggarwal, 2013). Por esta razão, a curcumina e seus derivados estão atraindo um crescente interesse na área de alimentos e farmacêutica. Assim, o desenvolvimento de estratégias para a melhoria na produção de curcuminoides puros, a partir do cultivo das plantas até o isolamento dessas molécula, representa uma tarefa essencial. Deste ponto de vista, o estudo da influência de fatores ambientais e tecnologias agrícolas é importante, pois esses fatores influenciam o acúmulo de biomassa, bem como a biossíntese de compostos bioativos. Os efeitos da luz, temperatura, nutrição mineral, manejo de irrigação, enxertia, assim como níveis de CO₂ atmosférico e fases de desenvolvimento das plantas têm sido extensivamente estudadas para compostos fenólicos (Treutter, 2010). Em particular, alguns estudos já foram realizados para determinar a influência da intensidade luminosa na produtividade e na qualidade da cúrcuma (Bhuiyan, Roy, Sharma, Rashid, & Bala, 2012; Hossain, Akamine, Ishimine, Teruya, Aniya., & Yamawaki, 2009; Padmapriya, Chezhiyan, & Sathiyamurthy, 2007; Srikrishnah & Sutharsan, 2015) e indicam que a espécie é tolerante a sombra parcial. Outros estudos, destinados a correlacionar o tempo de colheita com a biomassa e a produção de curcuminoides, foram realizados em diferentes regiões (Asghari; Mostajeran; Shebli, 2009; Cooray Et Al., 1988; Hossain, 2010; Kumar; Gill, 2009).

Deve salientar-se que *C. longa* é uma monocotiledôneas herbácea e perene, que mostra variações significativas no crescimento sob diferentes condições agro-climáticas (Nair, 2013), portanto, o tempo de maturidade e a resposta às condições de luz podem variar de acordo com o genótipo, com a região geográfica e aspectos edafo-climáticos. Estudos sobre a influência da maturidade na qualidade de *C. longa* no Brasil, bem como sobre a interação entre as condições de luz e a maturidade das plantas, não estão disponíveis na literatura.

No presente trabalho os efeitos de diferentes intensidades luminosas e da exclusão da radiação UV durante as fases de desenvolvimento de *C. longa* na produção de biomassa e no teor de curcuminoides foram estudados. Além disso, o isolamento e purificação dos curcuminoides produzidos foi otimizado. Atualmente, indústrias alimentícias e farmacêuticas empregam vários métodos cromatográficos, de ultrafiltração ou precipitação e métodos de extração com solventes para isolar biomoléculas de interesse (Kitts; Weiler, 2003). Estas técnicas mostram desvantagens significativas quando aplicado à escala industrial, tais como a instrumentação dispendiosa, procedimentos demorados, grandes quantidades de solventes orgânicos e resíduos. Em particular, a principal desvantagem de todos os procedimentos de cromatografia líquida em coluna é a impossibilidade de lidar com amostras biológicas contendo material em partículas, de modo que estas técnicas não são adequados para trabalhar nos estágios iniciais do processo de isolamento / purificação, quando sólidos em suspensão e componentes incrustantes estiverem presentes na amostra (Turková, 1978).

Recentemente, foi desenvolvido um novo processo de síntese para o material superparamagnético nanoestruturado na faixa de tamanho de cerca de 10 nm, constituído de maghemita estequiométrica (γ -Fe₂O₃) e mostrando peculiar comportamento químico de superfície, chamada Surface Active Maghemite Nanoparticles (SAMNs) (MAGRO et al., 2012a). SAMNs apresentam um momento magnético médio alto e alta estabilidade em água como suspensões coloidais, sem qualquer modificação superficial ou derivação de revestimento. Devido às suas propriedades físicas e químicas únicas, estas nanopartículas de óxido de ferro nuas são atualmente utilizadas para imobilizar várias biomoléculas (Sinigaglia, et al., 2012; Magro, et al., 2015; Venerando, et al., 2013), entre elas a curcumina (Magro, et al., 2014) e um protocolo de purificação para a purificação magnética de curcuminoides foi proposto (Magro, et al., 2015).

No presente trabalho o método de purificação anteriormente relatado foi melhorado, o rendimento de purificação foi aumentado vinte vezes, chegando a 96 %, com uma pureza de curcuminoides >98 %. A abordagem multidisciplinar do trabalho atual oferece oportunidades reais de inovação na produção de curcuminoides puros.

2. Material e Métodos

O experimento de cultivo foi realizado na fazenda experimental da Faculdade de Ciências Agrônômicas da Universidade Estadual Paulista - UNESP, Botucatu - SP, em São Manuel - SP (22°46'0,571 W "S e 48°34'11,32", de 744 metros).

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com cinco condições de luz e quatro tempos de colheita, em parcelas subdivididas no tempo, com cinco repetições de seis plantas. Os níveis de luz foram: A) exclusão da radiação UV; B) pleno sol, C) 30 % de sombreamento, D) 50 % de sombreamento e E) 70 % de sombreamento. As colheitas foram realizadas aos 65, 128, 174 e 203 dias após o plantio (DAP), correspondente a janeiro, abril, maio e junho de 2013.

As diferentes condições de luz foram obtidas em ambiente protegido com estruturas do tipo túnel alto, com 3 m de largura, 1,70 m de altura e 22,5 m de comprimento, revestidos por diferentes telas. O revestimento aplicado para excluir as radiações UV foi um filme de polietileno anti-UV (150 μm) (Trifilme, Plastilux, Sapucaia do Sul, Rio Grande do Sul, Brazil), caracterizado pela exclusão de mais de 80 % da radiação UV-B. Os revestimentos utilizados para controlar os níveis de sombreamento foram telas de polietileno preto com 30 %, 50 % e 70 % de sombreamento (Plastilux, Sapucaia do Sul, Rio Grande do Sul, Brazil).

Um analisador de gás infravermelho (LI-6400, Li-Cor Lincoln Inc., NE, EUA) foi utilizado para quantificar a radiação fotossinteticamente ativa (PAR). As medições foram realizadas entre as 09:00 e 11:00 hora, em dias sem nuvens, a cada mês durante o crescimento da planta. As medidas da PAR foram utilizadas para definir a quantidade de radiação presente em cada condição de exposição à luz: exclusão de UV (50,83 % PAR = 610 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$), 70 % de sombreamento (30 % PAR = 360 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$), 50 % de sombreamento (41,66 % PAR = 500 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$), 30 % de sombreamento (52,5 % PAR = 630 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) e pleno sol (100 % PAR = 1200 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$)

O solo foi classificado como latossolo vermelho, fase arenosa, e na camada de 0 a 0,20 m apresentava as seguintes características químicas (Camargo, Klamt, & Kauffman, 1987; Santos, et al., 2006): 12 g dm^{-3} de matéria orgânica; pH 5,4; 204 g dm^{-3} P; 2,5 mmolc dm^{-3} K; 39 mmolc dm^{-3} Ca; 11 mmolc dm^{-3} Mg; 71 mmolc dm^{-3} CTC; V % = 76.

Foram selecionados rizomas sementes com 12 cm de comprimento. O plantio foi realizado em leiras de 0,4 m de altura, espaçados de 0,5 m, cada propágulo foi plantado a 4 cm de profundidade.

Tratos culturais necessários, tais como controle de plantas daninhas e reparos nas leiras foram realizadas durante o crescimento das planta. As parcelas foram irrigadas diariamente, de acordo com a demanda de água registrada por tensiômetros, de forma que o solo estivesse próximo da sua capacidade de campo calculada. A irrigação foi suspensa 15 dias antes da colheita.

As plantas colhidas foram limpas, separadas em parte aérea, rizomas e raízes. Em seguida os rizomas foram pesados, cortados e secos em estufa de circulação forçada de ar a 65 ± 5 °C, até atingirem peso constante. Os rizomas secos das seis plantas de cada repetição foram então moídos e homogeneizados. O conteúdo de água nos rizomas foi de aproximadamente $82,84 \pm 0,75$ %.

2.1 Reagentes químicos

Os reagentes químicos foram comprados na pureza mais elevada disponível comercialmente e foram utilizados sem mais tratamento. Cloreto de Ferro (III) hexa-hidrato (97 %), borohidreto de sódio (NaBH_4) e etanol grau HPLC foram adquiridos da Sigma (Sigma-Aldrich, Italia) metanol, etanol, acetonitrila e ácido acético grau HPLC, bem como curcuminoides puros (curcumina, demetoxicurcumina e bisdemetoxicurcumina) foram adquiridos da Sigma (Sigma-Aldrich, Brasil).

2.2 Instrumentação

As medições de espectroscopia óptica foram realizadas em cubetas de quartzo de 1 cm usando um espectrofotômetro Cary 60 (Varian Inc., Palo Alto, CA, EUA).

Os espectros de ressonância de spin eletrônico (ESR) foram realizados em água, em um tubo de vidro (50 mL), à temperatura ambiente (21 °C) por um espectrofotômetro Bruker ER200D X-band ESR (Bruker, Germany). Os parâmetros experimentais foram: modulação do campo magnético 100 kHz; poder, -10 dB (20 mW); frequência, de 9,84 GHz; taxa de varredura, 20 Gauss s⁻¹; modulação de amplitude, 1 Gauss; constante de tempo, 1 s.

Uma série de Nd - Fe - B ímãs (N35, 263-287 kJ / m³ HB, 1170-1210 mT, Powermagnet, Alemanha) foi utilizado para a condução magnética de nanopartículas.

2.3 Síntese das Surface Active Maghemite Nanoparticles (SAMNs)

Uma síntese típica das nanopartículas já foi descrita (Magro, et al., 2012a; Magro, et al., 2012b) e pode ser resumida como se segue: FeCl₃·6H₂O (10.0 g, 37 mmol) foi dissolvido em água Milli-Q (800 mL) sob agitação vigorosa à temperatura ambiente. Uma solução de NaBH₄ (2 g, 53 mmol) em hidróxido de amônio (3,5 %, 100 mL, 4,86 mol mol⁻¹ Fe) foi rapidamente adicionada à mistura. Logo após a ocorrência de uma reação de redução, a temperatura do sistema foi aumentada para 100 °C e mantida constante durante 2 h. Em seguida, o material foi arrefecido à temperatura ambiente e curado em água, tal como preparado, durante 24 h. Este produto foi separado por imposição de um ímã externo e lavado várias vezes com água.

Este material foi transformado em um pó vermelho-castanho (produto de síntese final) por secagem e cura a 400 °C durante 2 h. O nanopó resultante mostrou resposta magnética, após a exposição a um campo magnético. A massa final do produto foi de 2,0 g (12,5 mmol) de Fe₂O₃, e um rendimento de 68 % foi calculado.

O material nanoparticulado resultante foi caracterizado por espectroscopia Mössbauer, espectroscopia FT-IR, microscopia eletrônica de transmissão de alta resolução, XRD e medidas de magnetização (Magro, et al., 2012b) e foi constituída de maghemita estequiométrica (γ -Fe₂O₃) com um diâmetro médio de 11 ± 2 nm, o que pode levar à formação, após a aplicação de ultra-sons em água (Bransonic, modelo 221, de 48 kHz, 50 W), de uma suspensão coloidal estável, sem qualquer revestimento orgânico ou inorgânico ou derivatização. A superfície destas nanopartículas de maghemita nuas mostra peculiares propriedades de ligação e pode ser derivatizada reversivelmente com moléculas orgânicas selecionadas. Chamamos essas nanopartículas nuas de Surface Active Maghemite Nanoparticles (SAMNs).

2.4 Determinação quantitativa de curcuminoides por HPLC

A extração e a determinação do teor dos curcuminoides bisdemetoxicurcumina (BDMC), demetoxicurcumina (DMC) e curcumina foram realizadas de acordo com He et al. (1998), com modificações.

Um sistema UHPLC (Ultimate 3000 BioRS, Dionex-Thermo Fisher Scientific Inc., EUA) equipado com um detector de díodos foi usado. Uma coluna Ace 5 C18 (Advanced Chromatography Technologies, UK) (5 µm, 25 cm × 4,6 mm) foi usada para análise de curcuminoides, a 48 °C. O perfil do gradiente da foi composta por água (0,25 % de ácido acético) (A), e acetonitrila (B), como se segue: 0-17 min, 40-60 % de B; 17-32 min, 60-85 % de B; 32-38 min, 85 % de B; 38-40 min, 85-40 % de B; 40-45 min, 40 % de B, com fluxo de 0,5 mL min⁻¹. O volume de injeção foi de 20 µl. Todas as amostras foram filtradas em filtros de membrana de 0,22 µm antes da injeção. Os curcuminoides foram identificados por tempos de retenção, conforme determinado com as injeções de padrões (curcumina, BDMC, DMC).

2.5 *Incubação de extratos de C. longa com nanopartículas magnéticas*

Rizomas secos e moídos de *C. longa* foram extraídos com etanol 99,6 % (20 mg mL⁻¹). Em seguida, os extratos foram incubados com 3 volumes de suspensão de SAMNs aquosa (25 % de concentração final de etanol). Duas concentrações finais de SAMNs foram testadas para a incubação, 1 g L⁻¹ e 10 g L⁻¹. Depois de 5 minutos de sonicação (Branson, modelo 221, de 48 kHz, 50 W) e 1 h de incubação, as SAMNs foram magneticamente recuperadas, com o auxílio de um magneto externo (Powermagnet, Alemanha), juntamente com o material ligado à superfície, e lavou-se três vezes com água destilada.

Em seguida o processo de destaque de substâncias incorporadas à superfície das nanopartículas foi realizado pela ressuspensão das SAMNs em etanol 99,6 %.

2.6 *Análise Estatística*

Os resultados experimentais foram expressos como valor médio (média ± desvio padrão). Os dados foram analisados usando Sigma Plot e o programa estatístico Assisat (versão 7.7 beta). As diferenças significativas entre as amostras foram avaliadas por análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste Tukey (P <0,05).

3. Resultados e Discussão

3.1 *Efeito da maturidade e das condições de luz no teor de curcuminoides em rizomas de C. longa*

O teor de curcuminoides em função da maturidade das plantas, expressa em dias após o plantio (DAP), é apresentado na Figura 1. Notavelmente, o teor de curcuminoides, expresso em mg por grama de massa seca de rizoma, decresceu com o tempo de maturação para todas as condições de luz testadas. A concentração de curcuminoides diminuiu seguindo um decaimento exponencial, e as constantes cinéticas de primeira ordem correspondentes foram calculadas para todas as condições de exposição à luz. Curiosamente, não há diferenças

significativas entre as constantes cinéticas de decaimento, pois não foram sensíveis a exposição à luz: o valor médio resultou $k = 3,0 \pm 0,2 \times 10^{-2} \text{ dias}^{-1}$. O teor de curcuminoides atingiu o patamar após 180 DAP, quando o teor foi cerca de 30 %, em relação à primeira determinação (65 DAP) (Figura 1).

De acordo com a literatura o teor curcuminoides nos rizoma de *C. longa* pode variar de 27 a 77 mg g^{-1} , em relação à massa seca total (Nair, 2013) e o teor de curcuminoides em função da maturidade da planta ainda é um tema de interesse na pesquisa.

Alguns autores relataram que a maior produção de curcuminoides foi alcançada em plantas colhidas com idade entre 5 e 9 meses, enquanto outros afirmaram que a maturidade da planta não influenciou a produção de curcuminoides (Asghari, et al, 2009; Cooray, et al, 1988; Gill & Manhas, 2012). Além disso, outros estudos já foram realizados sobre a influência da intensidade da luz na produtividade e na qualidade da cúrcuma (Bhuiyan, et al, 2012; Hossain, et al, 2009; Padmapriya, et al, 2007; Srikrishnah, et al, 2015), indicando que a espécie tem boa produtividade de curcumina sob sombreamento.

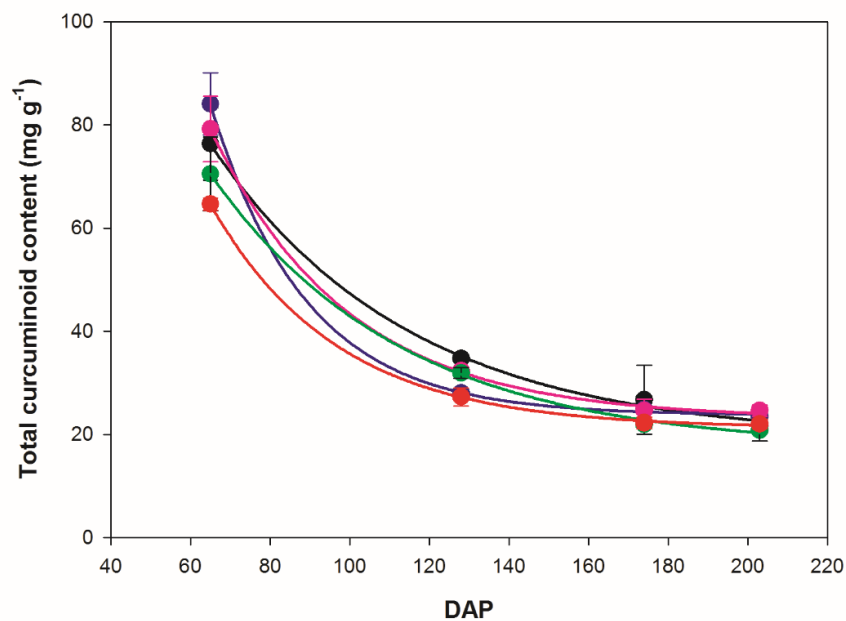


Figura 1: Teor de curcuminoides (mg g^{-1}) em plantas de *C. longa* cultivadas sob diferentes condições de luz em função da maturidade dos rizomas, expressa em dias após o plantio (DAP). Linha preta = exclusão da radiação UV; linha azul = 70 % de sombreamento; linha rosa = 50 % de sombreamento; linha verde = 30 % de sombreamento; linha laranja = pleno sol. As determinações em UHPLC foram realizadas em triplicata.

Nó observamos que aos 65 DAP a influência das condições de luz no teor de curcuminoides foi evidente, sendo que o teor de curcuminoides aumentou de acordo com a seguinte ordem (Figura 2): plantas sob pleno sol <30 % de sombreamento <50 % de sombreamento <70 % de sombreamento. Nas plantas sob exclusão da radiação UV solar o teor de curcuminoides resultou comparável ao teor obtido nas plantas sob 50 % de sombreamento.

Portanto, a concentração de curcuminoides nos rizomas aos 65 DAP depende mais dos níveis de sombreamento (intensidade da PAR) do que da exclusão da radiação UV.

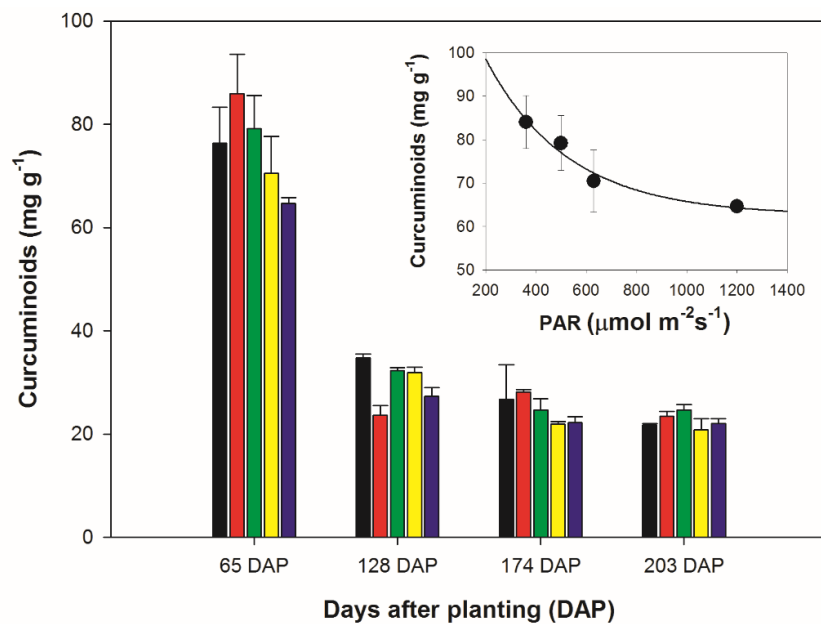


Figura 2: Teor de curcuminoides (mg g⁻¹) de *C. longa* cultivadas em diferentes condições de luz colhidas em diferentes DAP. As barras pretas = exclusão da radiação UV; barras vermelhas = 70 % de sombreamento; Barras verdes = 50 % de sombreamento; barras amarelas = 30 % de sombreamento; barras azuis = pleno sol. **Inserção:** curvas exponenciais do teor de curcuminoides (mg g⁻¹) de *C. longa* colhidas aos 65 DAP em função da incidência de PAR em diferentes níveis de sombreamento (70 %, 50 %, 30 % de sombreamento e pleno sol).

Além disso, a dependência do teor de curcuminoides em relação a PAR foi bem ajustada a uma curva exponencial, caracterizada pela constante de primeira ordem $k = 0,003 \pm 0,001 \text{ PAR}^{-1}$. A curva apresentou um platô a cerca de 1200 PAR (pleno sol) com concentração de curcuminoides equivalente a 75 % em relação às plantas cultivadas sob 70 % de sombreamento (Figura 2, inserção).

Concluindo, de acordo com nossos resultados, as plantas colhidas aos 65 DAP, cultivadas sob 70 % de sombreamento representam as melhores condições para a obtenção do mais alto teor de curcuminoides em rizomas de *C. longa* (Tabela 1).

Tabela 1: Biomassa de rizoma (g) e teor de curcuminoides (mg g^{-1}) em *C. longa* cultivada sob 70 % de sombreamento em diferentes tempos de maturação, expressos em dias após o plantio (DAP).

DAP	Biomassa	Curcuminoides
65	$35,6 \pm 2,3$	$84,03 \pm 6,06$
128	$140,2 \pm 24,6$	$24,83 \pm 0,68$
174	$353,3 \pm 35,7$	$28,03 \pm 0,36$
203	$476,8 \pm 32,0$	$23,47 \pm 0,92$

*Os valores são a média de três repetições com desvio padrão.

Com o objetivo de otimizar a produção de curcuminoides, bem como o rendimento de purificação para aplicação em escala industrial, a limitação da biomassa também representa um aspecto importante, além do alto teor de curcuminoides. Menor biomassa de rizomas com alta concentração de curcuminoides possibilita a redução dos custos relacionados com o transporte de matéria-prima, geração de resíduos e volumes de solventes no processo de extração. A biomassa produzida aos 65 DAP é consideravelmente menor, cerca de 7,5 % da biomassa total produzida no final do período de crescimento (Tabela 1).

Em outras palavras, a colheita aos 65 DAP deve envolver uma ordem de grandeza menor para o tratamento dos rizomas durante o processo de purificação, pois contêm teor cerca de quatro vezes mais elevado do que o teor de curcuminoides das plantas no final do período de crescimento.

3.2 *Ligação de curcuminoides e nanopartículas magnética*

Em um trabalho anterior, apresentamos um protocolo para a purificação de curcuminoides de *C. longa* por meio da SAMNs, por separação magnética, no qual o procedimento foi realizado por simples incubação de SAMNs nos extratos etanólicos do rizoma (Magro, et al., 2015). No presente estudo, a eficácia do processo foi melhorado, considerando-se a influência da polaridade do solvente no processo de incubação. Assim, sob condições de ligação otimizadas pela maior polaridade da solução de incubação, como descrito no material e métodos, a solubilidade dos curcuminoides diminuiu drasticamente com a introdução de água, e a modificação do solvente forçou a interação entre as biomoléculas e a superfície de nanopartículas.

Resumidamente, após a incubação das SAMNs com extratos de *C. longa* em 25 % de etanol, o nanobioconjugado formado (SAMN@curcuminoides) foi submetido a três ciclos de lavagem em água. A eventual perda de biomoléculas ligadas a partir da superfície das SAMNs foi seguido por espectroscopia UV-Vis e resultou abaixo do limite de detecção do instrumento (0,25 mg L⁻¹ de curcuminoides).

A microscopia eletrônica de transmissão (MET) foi usada para caracterizar o complexo entre nanopartículas magnéticas e curcuminoides (SAMN@curcuminoides).

Imagens de MTE mostraram a presença de uma matriz orgânica, formando um escudo de cerca de 2,0 nm ao redor das nanopartículas de óxido de ferro, caracterizado por uma densidade de elétrons menor, atribuível às camadas de moléculas de curcuminoides na superfície das SAMNs (Figura 3).

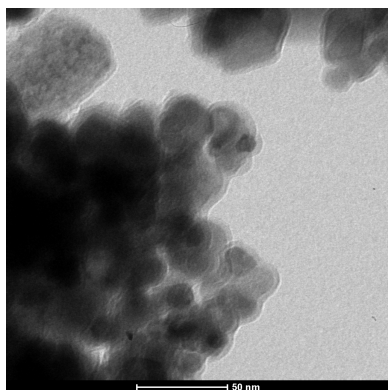


Figura 3: Imagem de microscopia eletrônica de transmissão (MET) de SAMNs incubadas com extratos em *C. longa*

O complexo SAMN@curcuminoides foi ainda caracterizado por espectroscopia UV-Vis e espectroscopia de FT-IR (dados não mostrados) confirmando a ligação dos curcuminoides nos locais com ferro (III) exposto, na superfície das SAMNs, como já foi observado em estudos anteriores (Magro et al, 2014; Magro, et al, 2015).

O espectro de UV-Vis do complexo SAMN@curcuminoides foi adquirido e comparado com os de SAMNs nuas e do extrato do rizoma de *C. longa* (Figura 4). O espectro de absorção eletrônica das SAMNs nuas, adquirido em água, mostrou uma banda larga com um máximo a cerca de 400 nm, como já relatado (Magro et al., 2012a). Os extratos de *C. longa* apresentaram uma intensa cor amarela (Rymbai, Sharma, & Srivastav, 2011) e o seu espectro foi caracterizado por um pico intenso a 430 nm, atribuível à presença de curcuminoides.

Por outro lado, o espectro ótico do complexo SAMN@curcuminoides resultou caracterizado pela presença de dois picos intensos, a 350 nm e 425 nm (Figura 4).

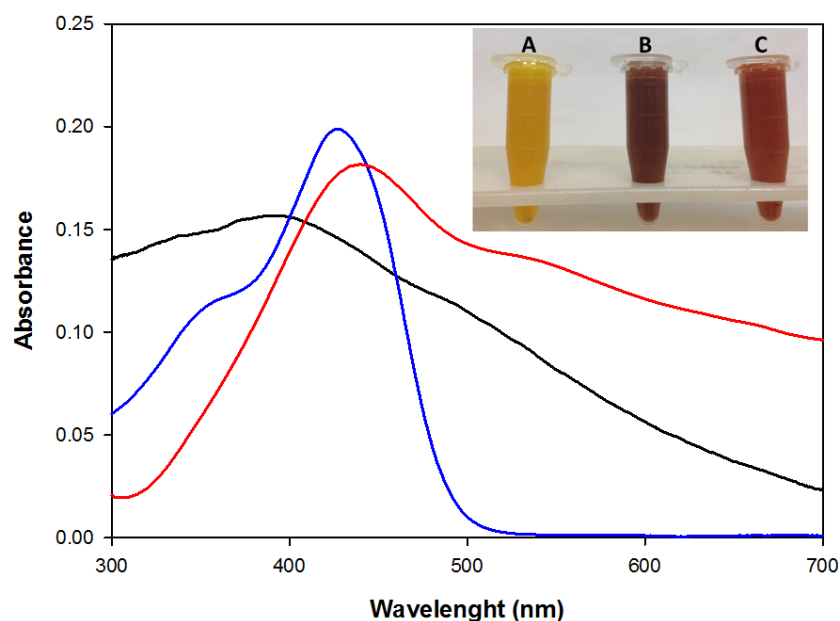


Figura 4: Espectros de UV-vis de SAMNs nuas e revestidas por curcuminoides (SAMN@ curcuminoides) em água. SAMN ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$) em água, linha preta; SAMN@curcuminoides ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$), linha vermelha; extrato do rizoma de *C. longa* (20 g L^{-1}) em etanol a 25 %, linha azul. **Inserção:** Fotografia dos materiais utilizados na purificação de curcuminoides. A) Extratos de *C. longa* (20 g L^{-1}) em etanol a 25 %; B) SAMNs (100 ng mL^{-1}) em água; C) SAMN@curcuminoides (100 ng mL^{-1}) em água.

Tal alteração espectral dramática, tanto em relação à forma e à posição, testemunharam a ocorrência da ligação e fornecem a evidência de sua natureza covalente, de acordo com a medição por pespectroscopia de ressonância de spin eletrônico (ESR) e com resultados apresentados em outros lugares (Magro, et al., 2015).

A ligação dos curcuminoides parece influenciar as propriedades ópticas das SAMN, como já relatado para nanomateriais híbridos, que podem mostrar propriedades peculiares, diferentemente daquelas herdadas de seus componentes. Além disso, a interação química entre curcuminoides e SAMNs foi visualmente testemunhada por uma modificação notável da cor da suspensão de SAMN, do marrom ao vermelho púrpura (Figura 4, inserção).

Deve ser mencionado que o complexo SAMN@curcuminoides foi muito estável em água e, se for armazenado a 4 °C, as moléculas orgânicas permanecem firmemente ligadas a superfície das SAMN durante pelo menos 12 meses.

O complexo SAMN@curcuminoides, foi ainda caracterizado por ESR. Em especial, os espectros de ESR de SAMNs e SAMN@curcuminoides foram adquiridos para evidenciar a ocorrência de ligação (Figura 5).

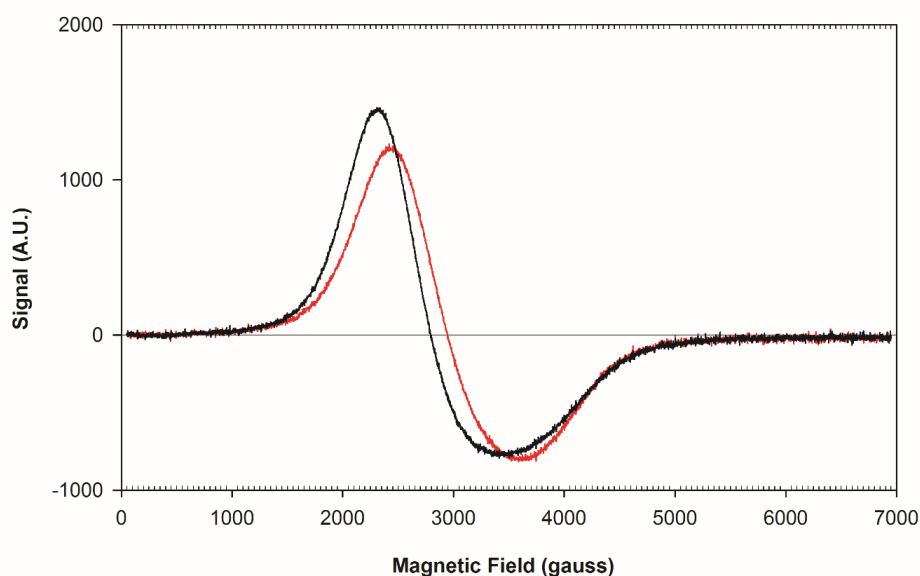


Figura 5: Espectros de ressonância de spin eletrônico (ESR) de SAMNs nuas e do complexo SAMN@curcuminoides. Espectro vermelho corresponde a SAMNs nuas e espectro preto corresponde ao complexo SAMN@curcuminoides.

Como mostrado na Figura 5, o espectro de ESR das SAMNs, à temperatura ambiente, apresentou um sinal de largura quase simétrico, caracterizado pelo campo com centro a 2940 Gauss, que corresponde ao fator g de 2,39, e uma largura de linha de 1200 Gauss. Diferentemente, o espectro de ESR do complexo SAMN@curcuminoides foi caracterizado por um campo com centro a 2850 (fator de 2,49 g) e uma largura de linha de Gauss de 1140 Gauss. A menor espessura da linha indica menos interações magnéticas entre partículas (Amstad, et al, 2011), e estas variações espectrais, no que dizem respeito a SAMNs nuas, sugerem uma forte ligação através de deslocalização de elétrons através da superfície do complexo SAMN@curcuminoides (Amstad, Fischer, Gehring, Textor, & Reimhult, 2011).

3.3 Recuperação de curcuminoides do complexo SAMN@curcuminoides

A concentração das nanopartículas durante a incubação com o extrato do rizoma influenciou a fração de curcuminoides destacada da superfície das SAMNs, assim a ligação dos curcuminoides foi testada em duas concentrações finais de SAMNs, 1,0 e 10,0 g L⁻¹.

Curiosamente, o maior rendimento de curcuminoides recuperado foi obtido a 1,0 g L⁻¹. Em particular, a fração de curcuminoides ligados, expresso em termos de % no que diz respeito à sua quantidade total no extrato, foi de 92,55 % a 1,0 g L⁻¹ de SAMNs, enquanto a 10,0 g L⁻¹ de SAMNs foi 80,57 % (Tabela 2).

Este resultado não foi surpreendente, considerando que, concentrações elevadas (10 g L⁻¹) e na presença de um solvente orgânico (etanol) podem levar à agregação parcial das SAMNs, reduzindo a área de superfície disponível para a ligação. Assim, no presente caso, a concentração mais baixa de SAMNs levou à maior estabilidade coloidal e à maior área de superfície das nanopartículas disponível para a ligação dos curcuminoides.

Tabela 2: Eficiência de ligação e destaque de curcuminoides na superfície das SAMNs em diferentes porcentagens de etanol (%) e concentrações de SAMNs (g L⁻¹). A porcentagem de curcuminoides ligados foi calculada em relação ao teor total nos extratos do rizoma de *C. longa* e a porcentagem de curcuminoides destados foi calculado em relação à quantidade de moléculas ligadas.

Etanol	SAMNs	Ligação	Destaque
25	1	92,55 ± 3,74	95,48 ± 7,83
25	10	80,57 ± 13,82	49,59 ± 5,33
100	1	9,67 ± 6,09	3,18 ± 0,35
100	10	4,89 ± 4,18	13,83 ± 1,60

* Os valores são a média e desvio padrão de três experimentos.

O processo de ligação de curcuminoides na superfície das SAMNs foi muito rápido (concluída dentro de 5 min) e o nanobioconjugado (SAMN@curcuminoides) resultante foi recolhido por meio da imposição de um magneto externo. Em seguida, foi extensivamente lavado com água deionizada para eliminar as substâncias fracamente ligadas. O destaque dos curcuminoides da superfície das nanopartículas, após a purificação magnética, foi realizada através da incubação do complexo SAMN@curcuminoides em etanol a 99,6 %. Sob estas condições, o destaque de curcuminoides do nanobioconjugado foi testado em 1,0 g L⁻¹ e 10,0 g L⁻¹. Os curcuminoides destacados foram 95,48 % e 49,59 %, respectivamente, em relação à quantidade de biomoléculas ligadas (Tabela 2).

Assim, a ligação de curcuminoides em $1,0 \text{ g L}^{-1}$ de SAMNs foi completamente reversível, e o sistema foi capaz de se ligar e recuperar quantitativamente as moléculas de curcuminoides presentes nos extratos do rizoma. Para comparação, em um estudo anterior, fomos capazes de purificar $3,95 \text{ mg g}^{-1}$ de pó de rizoma, por meio de nanopartículas magnéticas (Magro, et al., 2015), enquanto que no presente relato, o protocolo de purificação de curcuminoides foi aumentado para $69,7 \text{ mg g}^{-1}$ de pó de rizoma de *C. longa*, correspondente a um aumento de rendimento de cerca de 17,5 vezes, utilizando uma concentração de SAMNs corresponde a uma ordem de grandeza menor.

O processo proposto para a purificação da curcumina pode ser resumido da seguinte forma: o pó do rizoma de *C. longa* foi extraído com etanol a 99,6 % (1:60 w / v), auxiliado por 5 minutos de sonicação. Após a decantação (10 min) o sobrenadante foi incubado com SAMNs ($1,0 \text{ g L}^{-1}$) durante 1 h, sob agitação, à temperatura ambiente.

A suspensão contendo as nanopartículas foi submetida a separação magnética e o sobrenadante resultante foi eliminado. O complexo SAMN@curcuminoides recolhido foi lavado com água destilada. O destaque dos curcuminoides ligados às nanopartículas foi realizado por uma incubação subsequente do complexo SAMN@curcuminoides em 99,6 % de etanol (1:60 w / v) durante 1 h sobre agitação e protegido da luz, à temperatura ambiente.

Os curcuminoides destacados das nanopartículas em etanol foram secos sob baixo vácuo (100 torr) a $40 \text{ }^\circ\text{C}$. Esse material foi ressuspendido e analisado em HPLC, revelando que consiste em 64,0 % de curcumina, 17,0 % demetoxicurcumina e 19,0 % de bisdemetoxicurcumina, com uma pureza $> 98 \%$.

4. Conclusões

A abordagem multidisciplinar relatada, do cultivo à nanotecnologia teve como objetivo proporcionar a melhoria na produção e na purificação de curcuminoides, destinada a escala industrial. O tempo ideal de colheita, bem como a melhor condição de exposição à luz foram individualizados em função do teor de curcuminoides.

A colheita aos 65 DAP e o cultivo sob 70 % de sombreamento representaram as melhores condições de cultivo na região agro-climática testada. Deve ser salientado que estes resultados podem ser muito úteis para reduzir os custos ligados ao transporte de matéria-prima, a produção de resíduos e volume do solvente no processo de extração dos curcuminoides. Além do cultivo, o protocolo de purificação de curcuminoides dos extratos dos rizomas de *C. longa* com nanopartículas magnéticas, chamadas Surface Active Maghemite Nanoparticles (SAMNs) foi otimizado e o rendimento do processo proposto foi fortemente melhorado. O rendimento alcançado foi 69,7 mg de curcuminoides g⁻¹ de pó de rizoma de *C. longa*, um aumento correspondente a 17,6 vezes, em relação ao protocolo anteriormente relatado, levando à recuperação de > 98 % de curcuminoides, oferecendo possibilidades reais para a produção industrial competitiva de curcuminoides.

Agradecimentos

Os autores agradecem o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES - Brasil), processo 99.999.010436 / 2014-06 Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq - Brasil), processo 478372 / 2013-2 e processar 306.151 / 2012- 0 e Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP - Brasil), processo 2013 / 05644-3. Além disso, os autores agradecem Universidade de Pádua (Itália) pela concessão "Assegni di Ricerca Junior" 2014 n. CPDR148959 e Fundação CARIPARO pelo apoio.

5. Referências

- AMSTAD, E., GEHRING, A. U., FISCHER, H., NAGAIYANALLUR, V. V., HÄHNER, G., TEXTOR, M., & REIMHULT, E. (2011). Influence of electronegative substituents on the binding affinity of catechol-derived anchors to Fe₃O₄ nanoparticles. **Journal of Physical Chemistry**, v. 115, p. 683–691.
- AMSTAD, E., FISCHER, H., GEHRING, A. U., TEXTOR, M., & REIMHULT, E. (2011). Magnetic decoupling of surface Fe³⁺ in magnetite nanoparticles upon nitrocatechol-anchored dispersant binding. **Chemistry - A European Journal**, v. 17, p. 7396 – 7398.
- ANDREOTTI, C.; COSTA, G.; TREUTTER, D. Composition of phenolic compounds in pear leaves as affected by genetics, ontogenesis and the environment. **Scientia Horticulturae**, v. 109, p. 130–137, 2006.
- ASGHARI, G.; MOSTAJERAN, A.; SHEBLI, M. Curcuminoid and essential oil components of turmeric at different stages of growth cultivated in Iran. **Research in Pharmaceutical Sciences**, v. 4, n. 1, p. 55–61, 2009.
- BAMBIRRA, M. L. A.; JUNQUEIRA, R. G.; GLÓRIA, M. B. A. Influence of post harvest processing conditions on yield and quality of ground turmeric (*Curcuma longa* L.). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 45, n. 4, p. 423–429, dez. 2002.
- BERBERICH, T.; SAGOR, G. H. M.; KUSANO, T. Polyamines in Plant Stress Response. In: KUSANO, T.; SUZUKI, H. (Eds.). **Polyamines**. [s.l.] Springer Japan, 2015. p. 155–168.
- BERGQUIST, S. A. et al. Flavonoids in Baby Spinach (*Spinacia oleracea* L.): Changes during Plant Growth and Storage. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 53, p. 9459–9464, 2005.
- BHUIYAN, M. M. R. et al. Impact of multistoreyed agro-forestry systems on growth and yield of turmeric and ginger at Mymensingh, Bangladesh. **eSci Journal of Crop Production**, v. 1, n. 1, p. 19–23, 15 dez. 2012.
- BORSARI, M. et al. Curcuminoids as potential new iron-chelating agents: spectroscopic, polarographic and potentiometric study on their Fe(III) complexing ability. **Inorganica Chimica Acta**, v. 328, n. 1, p. 61–68, jan. 2002.
- CAMARGO, M. N.; KLAMT, E.; KAUFFMAN, J. H. **Classificação de solos usada em levantamentos pedológicos no Brasil**. Campinas: EMBRAPA-SNLCS, 1987.
- CHENG, S. et al. Molecular identification of phenylalanine ammonia-lyase as a substrate of a specific constitutively active Arabidopsis CDPK expressed in maize protoplasts. **FEBS**

Letters, v. 503, n. 2-3, p. 185–188, 17 ago. 2001.

COORAY, N. et al. Effect of maturity on some chemical constituents of turmeric (*Curcuma longa* L.). **J. Natn. Sci. Coun. Sri Lanka**, v. 16, n. 1, p. 39–51, 1988.

DÍAZ, B. M. et al. Impact of ultraviolet-blocking plastic films on insect vectors of virus diseases infecting crisp lettuce. **HortScience**, v. 41, p. 711–716, 2006.

DIXIT, D.; SRIVASTAVA, N. K. Partitioning of ¹⁴C-photosynthate of leaves in roots, rhizome, and in essential oil and curcumin in turmeric (*Curcuma longa* L.). **Photosynthetica**, v. 38, p. 275–280, 2000a.

DIXIT, D.; SRIVASTAVA, N. K. Distribution of photosynthetically fixed ¹⁴CO₂ into curcumin and essential oil in relation to primary metabolites in developing turmeric (*Curcuma longa*) leaves. **Plant Science**, v. 152, p. 165–171, 2000b.

ESATBEYOGLU, T. et al. Curcumin - vom Molekül zur biologischen Wirkung. **Angewandte Chemie**, v. 124, n. 22, p. 5402–5427, 29 maio 2012.

FROHNMEYER, H.; STAIGER, D. Ultraviolet-B radiation-mediated responses in plants. Balancing damage and protection. **Plant physiology**, v. 133, n. 4, p. 1420–8, 1 dez. 2003.

GARCÍA-MACÍAS, P. et al. Changes in the flavonoid and phenolic acid contents and antioxidant activity of red leaf lettuce (Lollo Rosso) due to cultivation under plastic films varying in ultraviolet transparency. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 10168–10172, 2007.

GHASEMZADEH, A. et al. Effect of Different Light Intensities on Total Phenolics and Flavonoids Synthesis and Anti-oxidant Activities in Young Ginger Varieties (*Zingiber officinale* Roscoe). **International Journal of Molecular Sciences**, v. 11, p. 3885–3897, 2010.

GILL, S. S.; TUTEJA, N. Polyamines and abiotic stress tolerance in plants. **Plant signaling & behavior**, v. 5, n. 1, p. 26–33, jan. 2010.

GUPTA, S. C.; KISMALI, G.; AGGARWAL, B. B. Curcumin, a component of turmeric: from farm to pharmacy. **BioFactors (Oxford, England)**, v. 39, n. 1, p. 2–13, jan. 2013.

HACKETT, W. P. Differential expression and functional significance of anthocyanins in relation to phasic development in *Hedera helix* L. **Advances in Botanical Research**, v. 37, p. 95–102, 2002.

HERTWIG, I. VON. Curcuma. In: **Plantas medicinais e aromáticas**. São Paulo: Icone, 1986. p. 254–65.

HORÁK, D. et al. Preparation and properties of magnetic nano- and micro-sized particles for biological and environmental separations. **Journal of separation science**, v. 30, n. 11, p. 1751–72, jul. 2007.

HOSSAIN, M. A. et al. Effects of Relative Light Intensity on the Growth, Yield and Curcumin Content of Turmeric (*Curcuma longa* L.) in Okinawa, Japan. **Plant Production Science**, v. 12, p. 29–36, 2009.

HOSSAIN, M. A. Effects of Harvest Time on Shoot Biomass and Yield of Turmeric (*Curcuma longa* L.) in Okinawa, Japan. v. 13, n. June 2009, 2010.

HOSSAIN, M. A.; ISHIMINE, Y. Growth, Yield and Quality of Turmeric (*Curcuma longa* L.) Cultivated on Dark-red Soil, Gray Soil and Red Soil in Okinawa, Japan. **Plant Production Science**, v. 8, n. 4, p. 482–486, 22 dez. 2005.

JANSEN, M. A. ; GABA, V.; GREENBERG, B. M. Higher plants and UV-B radiation: balancing damage, repair and acclimation. **Trends in Plant Science**, v. 3, n. 4, p. 131–135, 4 abr. 1998.

- JANSEN, M. A. K. et al. Plant stress and human health: Do human consumers benefit from UV-B acclimated crops? **Plant Science**, v. 175, n. 4, p. 449–458, out. 2008.
- JAYAPRAKASHA, G. K.; JAGAN MOHAN RAO, L.; SAKARIAH, K. K. Chemistry and biological activities of *C. longa*. **Trends in Food Science & Technology**, v. 16, n. 12, p. 533–548, dez. 2005.
- KANDIANNAN, K.; CHEMPAKAM, B.; KRISHNAMURTHY, K. Turmeric. In: PARTHASARATHY, V. A.; KANDIANNAN, K.; SRINIVASAN, V. (Eds.). . **Organic Spices**. 1. ed. [s.l.] New India Publishing, 2008. p. 387–438.
- KATSUYAMA, Y. et al. Curcuminoid biosynthesis by two type III polyketide synthases in the herb *Curcuma longa*. **The Journal of biological chemistry**, v. 284, n. 17, p. 11160–70, 24 abr. 2009.
- KITTS, D.; WEILER, K. Bioactive Proteins and Peptides from Food Sources. Applications of Bioprocesses used in Isolation and Recovery. **Current Pharmaceutical Design**, v. 9, n. 16, p. 1309–1323, 1 jun. 2003.
- KOLB, C. A. et al. UV screening by phenolics in berries of grapevine (*Vitis vinifera*). **Functional Plant Biology**, v. 30, p. 1177–1186, 2003.
- KRIZEK, D. T. et al. Inhibitory effects of ambient levels of solar UV-A and UV-B radiation of growth of cv. New Red Fire lettuce. **Physiologia Plantarum Plant.**, v. 103, n. 1, p. 1–7, maio 1998.
- KRUMBEIN, ANGELIKA, SAEGER-FINK HEIDI, S. I. Changes in quercetin and kaempferol concentrations during broccoli head ontogeny in three broccoli cultivars. **Journal of applied botany and Food Quality**, v. 81, p. 136–139, 2007.
- KULKARNI, S. J. et al. Extraction and purification of curcuminoids from Turmeric (*Curcuma longa* L.). p. 81–84, 2012.
- KUMAR, B.; GILL, B. S. Effect of method of planting and harvesting time on growth, yield and quality of turmeric (*Curcuma longa* L.). **Journal of Spices and Aromatic Crops**, v. 18, n. 1, p. 22–27, 2009.
- LARCHER, W. **Ecofisiologia vegetal**. São Carlos - SP: Rima, 2000.
- LAVOLA, A. et al. Allocation of carbon to growth and secondary metabolites in birch seedlings under UV-B radiation and CO₂ exposure. **Physiologia Plantarum**, v. 109, n. 3, p. 260–267, 25 jul. 2000.
- LI, S. et al. Chemical Composition and Product Quality Control of Turmeric (*Curcuma longa* L.). **Pharmaceutical Crops**, v. 2, p. 28–54, 2011.
- LORENZI, H.; MATOS, F. DE A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. 2. ed. Nova Odessa: Plantarum, 2002.
- LUTHRIA, D. L.; MUKHOPADHYAY, S.; KRIZEK, D. T. Content of total phenolics and phenolic acids in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) fruits as influenced by cultivar and solar UV radiation. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 19, p. 771–777, 2006.
- LÜTZ, C. et al. Simulated solar irradiation with enhanced UV-B adjust plastid- and thylakoid-associated polyamine changes for UV-B protection. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1710, p. 24–33, 15 nov. 2005.
- MACKAY, M. E. General Strategies for Nanoparticle Dispersion. **Science**, v. 311, n. 5768, p. 1740–1743, 24 mar. 2006.
- MAGRO, M. et al. **Maghemite nanoparticles and method for preparing thereof**, 17 mar. 2012a. Disponível em: <<https://www.google.com/patents/US8980218>>. Acesso em: 19 nov. 2015

- MAGRO, M. et al. Charge binding of rhodamine derivative to OH- stabilized nanomaghemite: universal nanocarrier for construction of magnetofluorescent biosensors. **Acta biomaterialia**, v. 8, n. 6, p. 2068–76, jul. 2012b.
- MAGRO, M. et al. A magnetically drivable nanovehicle for curcumin with antioxidant capacity and MRI relaxation properties. **Chemistry (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)**, v. 20, n. 37, p. 11913–20, 8 set. 2014.
- MAGRO, M. et al. Magnetic purification of curcumin from *Curcuma longa* rhizome by novel naked maghemite nanoparticles. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 63, n. 3, p. 912–20, 28 jan. 2015.
- MAHESHWARI, R. K. et al. Multiple biological activities of curcumin: a short review. **Life sciences**, v. 78, n. 18, p. 2081–7, 27 mar. 2006.
- MALLICK, N.; MOHN, F. H. Reactive oxygen species: response of algal cells. **Journal of Plant Physiology**, v. 157, n. 2, p. 183–193, ago. 2000.
- MANHAS, S. S.; GILL, B. S. Effect of different cultural practices on production of turmeric (*Curcuma longa* L.) in Punjab. **Journal of Spices and Aromatic Crops**, v. 21, n. 1, p. 53–58, 2012.
- MARCHESE, J. A. et al. Carbon isotope composition as a tool to control the quality of herbs and medicinal plants. **Photosynthetica**, v. 44, p. 155–159, 2006.
- MARÍN, A. et al. Characterization and quantitation of antioxidant constituents of sweet pepper (*Capsicum annuum* L.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 3861–3869, 2004.
- MIERZIAK, J.; KOSTYN, K.; KULMA, A. Flavonoids as Important Molecules of Plant Interactions with the Environment. **Molecules**, v. 19, p. 16240–16265, jan. 2014.
- NAIR, K. P. P. The Botany of Turmeric. In: **The Agronomy and Economy of Turmeric and Ginger: the invaluable medicinal spice crops**. Amsterdam: Elsevier, 2013. p. 7–32.
- PADMAPRIYA, S.; CHEZHIYAN, N.; SATHIYAMURTHY, V. A. Effect of shade and integrated nutrient management on biochemical constituents of turmeric (*Curcuma longa* L.). **Journal of Horticultural Sciences**, v. 2, n. 2, p. 123–129, 2007.
- POTHITIRAT, W.; GRITSANAPAN, W. Variability of curcuminoids: anti-oxidative components in ethanolic turmeric extract determined by UV and HPLC methods. **Acta Horticulturae**, v. 786, p. 175–184, 2008.
- PRASAD, S.; AGGARWAL, B. B. Turmeric - the Golden Spice. In: BENZIE, I.; WACHTEL-GALOR, S. (Eds.). **Herbal Medicine: Biomolecular and Clinical Aspects**. 2. ed. Boca Raton (FL): CRC Press, 2011.
- SANTOS, H. G. et al. **Sistema brasileiro de classificação de solos**. 2. ed. Rio de Janeiro: Embrapa solos, 2006.
- SCANDALIOS, J. G. Oxidative stress: Molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 38, p. 995–1014, 2005.
- SFICHI, L.; LOANNIDIS, N.; KOTZABASIS, K. Thylakoid-associated Polyamines Adjust the UV-B Sensitivity of the Photosynthetic Apparatus by Means of Light-harvesting Complex II Changes¶. **Photochemistry and Photobiology**, v. 80, n. 3, p. 499–506, 30 abr. 2004.
- SINGH, S.; PANDA, M. K.; NAYAK, S. Evaluation of genetic diversity in turmeric (*Curcuma longa* L.) using RAPD and ISSR markers. **Industrial Crops and Products**, v. 37, p. 284–291, maio 2012.

- SINIGAGLIA, G. et al. Catalytically active bovine serum amine oxidase bound to fluorescent and magnetically drivable nanoparticles. **International journal of nanomedicine**, v. 7, p. 2249–59, jan. 2012.
- SMITH, J.; BURRITT, D.; BANNISTER, P. Ultraviolet-B radiation leads to a reduction in free polyamines in *Phaseolus vulgaris* L. **Plant Growth Regulation**, v. 35, n. 3, p. 289–294, 2001.
- SOLOVCHENKO, A.; SCHMITZ-EIBERGER, M. Significance of skin flavonoids for UV-B-protection in apple fruits. **Journal of Experimental Botany**, v. 54, n. 389, p. 1977–1984, 2003.
- SRIKRISHNAH, S.; SUTHARSAN, S. Effect of Different Shade Levels on Growth and Tuber Yield of Turmeric (*Curcuma longa* L.) In the Batticaloa District of Sri Lanka. **American-Eurasian J. Agric. & Environ. Sci.**, v. 15, n. 5, p. 813–816, 2015.
- SRIVASTAVA, N. K.; SHARMA, S.; MISRA, A. Influence of Zn on allocation of leaf-assimilated ¹⁴CO₂ into primary metabolites in relation to production of essential oil and curcumin in Turmeric (*Curcuma longa* L.). **World Journal of Agricultural Sciences**, v. 2, p. 201–207, 2006.
- SURESH, D.; MANJUNATHA, H.; SRINIVASAN, K. Effect of heat processing of spices on the concentrations of their bioactive principles: Turmeric (*Curcuma longa*), red pepper (*Capsicum annum*) and black pepper (*Piper nigrum*). **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 20, n. 3-4, p. 346–351, maio 2007.
- TAKAHASHI, S. et al. The solar action spectrum of photosystem II damage. **Plant physiology**, v. 153, n. 3, p. 988–93, 1 jul. 2010.
- TREUTTER, D. Managing Phenol Contents in Crop Plants by Phytochemical Farming and Breeding — Visions and Constraints. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 11, p. 807–857, 2010.
- TROPICOS. **Tropicos.org - Curcuma longa L.** Disponível em: <<http://www.tropicos.org/Name/34500029>>. Acesso em: 6 jan. 2014.
- TSORMPATSIDIS, E. et al. UV irradiance as a major influence on growth, development and secondary products of commercial importance in Lollo Rosso lettuce “Revolution” grown under polyethylene films. **Environmental and Experimental Botany**, v. 63, p. 232–239, 2008.
- TURKOVÁ, J. **Affinity Chromatography**. 1. ed. Amsterdam, The Netherlands: Elsevier Scientific Publishing Company, 1978.
- VALLEJO, F.; GARCÍA-VIGUERA, C.; TOMÁS-BARBERÁN, F. A. Changes in broccoli (*Brassica oleracea* L. Var. *italica*) health-promoting compounds with inflorescence development. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 51, p. 3776–3782, 2003.
- VENERANDO, R. et al. Magnetic Nanoparticles with Covalently Bound Self-Assembled Protein Corona for Advanced Biomedical Applications. **The Journal of Physical Chemistry**, v. 117, n. 39, p. 20320–20331, 3 out. 2013.
- WANG, Y.; HU, W.; WANG, M. HPLC determination of three curcuminoid constituents in rhizoma *Curcumae*. **Acta Pharmaceutica Sinica**, 1999.

4. APÊNDICE

Imagens ilustrativas do local do experimento e da estrutura utilizada durante o cultivo de *Curcuma longa*.



Preparo do solo



Implantação das estruturas



Emergência das plantas nas leiras irrigadas



Controle da irrigação por tensiômetros



Medição da PAR e avaliação de trocas gasosas com analisador de gás infravermelho (LI-6400, Li-Cor Inc. Lincoln, NE, EUA)

Visão geral do experimento aos 128 dias após o plantio (DAP).



Tratamento 1 = Polietileno anti-UV
PAR = $610 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$



Tratamento 2 = 70 % de sombreamento
PAR = $360 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$



Tratamento 3 = 50 % de sombreamento
PAR = $500 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$



Tratamento 4 = 30 % de sombreamento
PAR = $630 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$

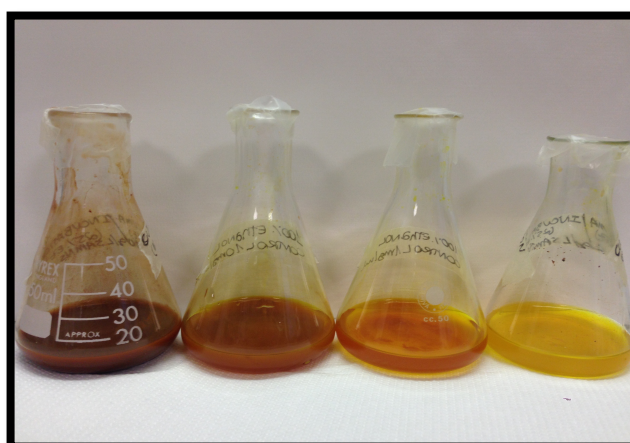


Tratamento 5 = pleno sol
PAR = $1.200 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$

Plantas de *Curcuma longa* colhidas aos 128 DAP e incubação dos extratos com nanopartículas magnéticas



Plantas de *Curcuma longa* colhidas aos 128 DAP. Da esquerda para a direita, plantas cultivadas sob anti-UV, 70 %, 50 %, 30 % de sombreamento e pleno sol.



Incubação de extratos de *Curcuma longa* com nanopartículas magnéticas SAMNs. Da esquerda para a direita, 25 % etanol em 10 g L⁻¹ SAMNs, 25 % etanol em 1 g L⁻¹ SAMNs, 100 % etanol em 10 g L⁻¹ SAMNs e 100 % etanol em 1 g L⁻¹ SAMNs.

Determinação do teor de curcuminoides por cromatografia líquida de alta eficiência. Cromatograma dos padrões de curcuminoides e do extrato de *Curcuma longa*.

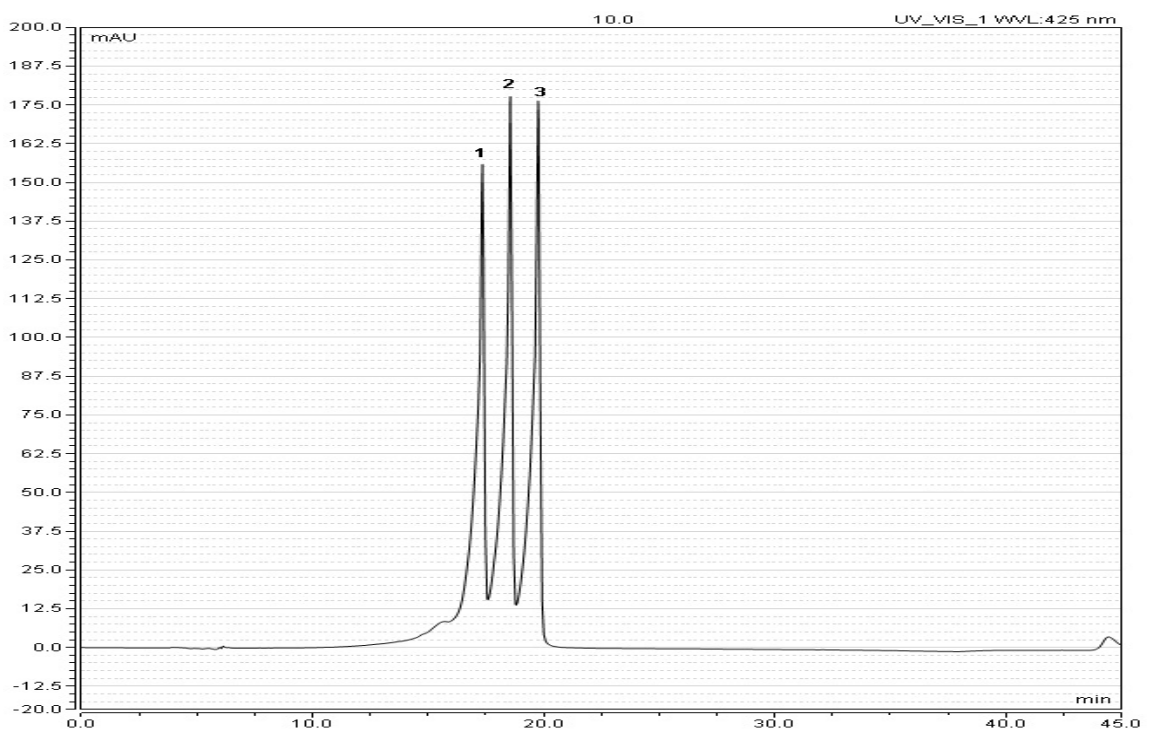


Figura. 1. Cromatograma UHPLC-UV (425 nm) dos padrões de curcuminoides (Sigma-Aldrich). Bisdemetoxicurcumina (Pico1), demetoxicurcumina (Pico 2) e curcumina (Pico 3).

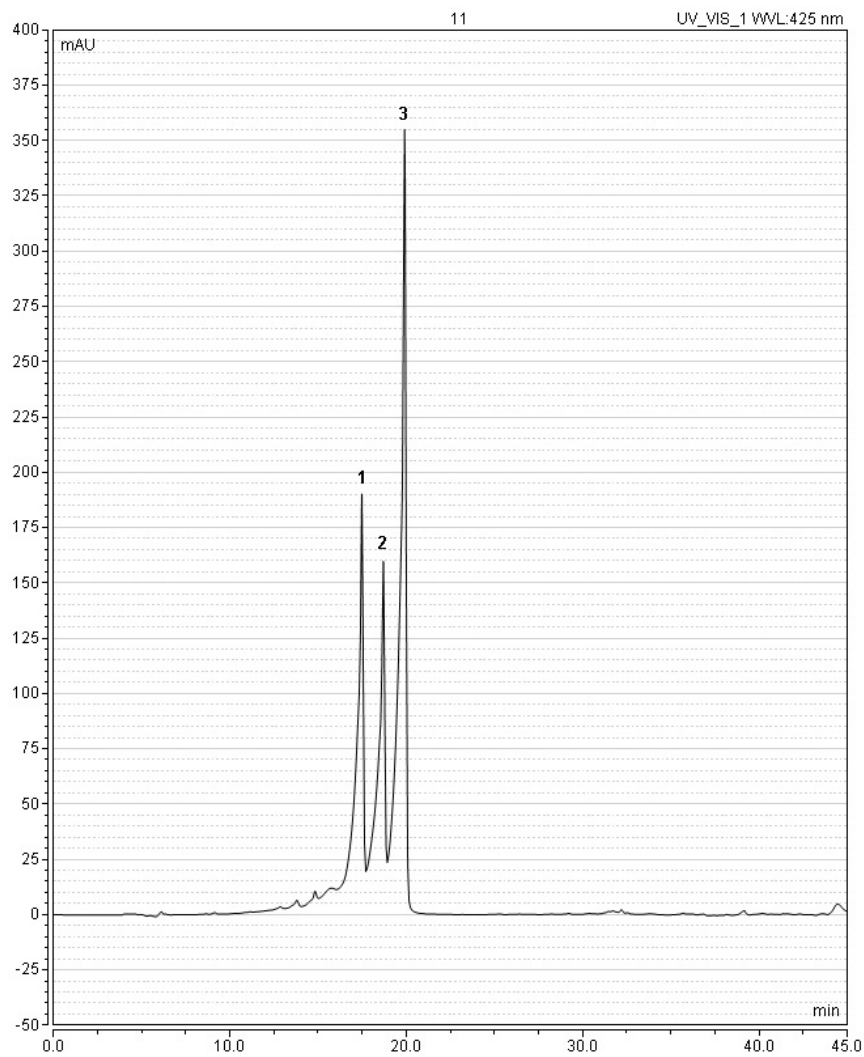


Figura 2. Cromatograma UHPLC-UV (425 nm) dos extratos metanólicos dos rizomas de *Curcuma longa* colhida aos 203 dias após o plantio. Bisdemetoxicurcumina (Pico1), demetoxicurcumina (Pico 2) e curcumina (Pico 3).

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Considerando que a eficiência fotossintética e os teores de curcuminoides produzidos durante o ciclo de cultivo de *C. longa* diminuíram com a maturidade dos tecidos, especialmente durante o período de senescência das folhas, pois folhas mais velhas são fisiologicamente menos ativas, entendemos que a determinação do tempo ideal para a colheita deve sempre levar em consideração o objetivo final da produção.

De forma geral, independente das condições de luz, observamos maiores teores de curcuminoides nos rizomas das plantas jovens, e ao mesmo tempo menor biomassa, sendo esse manejo interessante quando o destino do material vegetal produzido for industrial, para o isolamento de curcuminoides. Por outro lado, maior produção de biomassa ao final do ciclo de cultivo, acompanhando o crescimento da planta, gera também maior produção total de curcuminoides, apesar de o teor de curcuminoides ser menor nesta fase do ciclo da cultura. Sendo então coerente proceder a colheita nesta fase, se o objetivo for a produção dos rizomas.

Em relação às condições de luz podemos considerar que a espécie se adapta bem a ambientes parcialmente sombreados, pois maior produção de biomassa e também de curcuminoides estão relacionados com os ambientes protegidos da alta intensidade luminosa e da radiação UV. Aliando-se essas duas formas de manejo, condições de luz e tempo de colheita, é possível se atingir um bom rendimento da cultura.

Este estudo confirma os pressupostos de que a *C. longa* é parcialmente tolerante ao sombreamento, pois quando cultivadas sob alta intensidade luminosa, a pleno sol, bem como quando cultivadas sob baixa intensidade luminosa, os parâmetros fotossintéticos e, conseqüentemente, a produção de biomassa é prejudicada.

Além disso, sob alta intensidade luminosa o teor de curcuminoides é menor, sendo possível supor que esta diminuição está relacionada ao consumo dessas moléculas altamente antioxidantes na neutralização de radicais livres, gerados pelo estresse induzido pela alta intensidade luminosa e radiação UV solar, uma vez que a atividade das enzimas PAL e POD, bem como o teor de Spm e de compostos fenólicos das folhas também são aumentados nessas condições.

Ou ainda podemos supor que as plantas cultivadas a pleno sol, as quais apresentaram menor desempenho fotossintético e produção de biomassa tiveram menor translocação de fotoassimilados para os rizomas, resultando em menores teores de curuminóides, pois o seu desenvolvimento e o subsequente acúmulo de curcumina depende da translocação de fotoassimilados das folhas para o rizomas.

Além disso outro importante resultado a salientar é que o método de purificação com nanopartículas magnéticas (SAMNs) anteriormente empregado foi melhorado. Assim, a abordagem multidisciplinar do trabalho atual oferece oportunidades de inovação na produção de *C. longa* e de seus curcuminóides puros.

6. CONCLUSÃO GERAL

O desempenho ecofisiológico, a atividade enzimática, o teor de poliaminas, fenóis totais e curcuminoides foram avaliados sob diferentes intensidade de luz e sob a exclusão da radiação UV, em função das fases do desenvolvimento de *C. longa*, viabilizando a individualização da melhor condição de exposição à luz, bem como do tempo ideal para a colheita, visando a produção de rizomas de alta qualidade .

Observamos que independentemente das condições de luz, o acúmulo de biomassa das folhas apresentou aumento até a segunda colheita, já a biomassa dos rizomas apresentou aumento linear, no intervalo de tempo estudado. Notavelmente, nas plantas protegidas do UV o aumento da assimilação de CO₂, durante todo o ciclo da cultura, proporcionou incremento na produção de biomassa e, conseqüentemente, no rendimento total de curcumina e de curcuminoides.

Em relação ao teor de curcuminoides, ao final do ciclo de cultivo (203 DAP), o teor de curcumina e DMC não foram afetados pelas diferentes condições de luz; e o ambiente protegido da radiação UV proporcionou o menor teor de BDMC. Concluimos que a luz solar plena é um ambiente estressante para o cultivo de *C. longa* e a exclusão da radiação UV fornecida pelo filme de polietileno anti-UV durante o crescimento das plantas conduziu a melhorias em termos de assimilação de CO₂, biomassa e rendimento final de curcuminoides totais.

Porém, encontramos maior teor de curcuminoides no início do cultivo, aos 65 DAP. Nesta fase o ambiente com 70 % de sombreamento foi considerado o melhor para a produção de curcuminoides, visando o processo de purificação, já que nesta fase a biomassa é marcadamente menor.

Para a purificação dos curcuminoides de *C. longa* otimizamos um protocolo já estabelecido, utilizando nanopartículas magnéticas, chamadas de Surface Active Maghemite Nanoparticles (SAMNs). O rendimento de purificação alcançado foi 17,6 maior, em relação ao protocolo anteriormente relatado, levando à recuperação de > 98 % desses compostos, oferecendo possibilidades reais para a sua produção industrial competitiva.

7. REFERÊNCIAS

- ANDREOTTI, C.; COSTA, G.; TREUTTER, D. Composition of phenolic compounds in pear leaves as affected by genetics, ontogenesis and the environment. **Scientia Horticulturae**, v. 109, p. 130–137, 2006.
- ASGHARI, G.; MOSTAJERAN, A.; SHEBLI, M. Curcuminoid and essential oil components of turmeric at different stages of growth cultivated in Iran. **Research in Pharmaceutical Sciences**, v. 4, n. 1, p. 55–61, 2009.
- BAMBIRRA, M. L. A.; JUNQUEIRA, R. G.; GLÓRIA, M. B. A. Influence of post harvest processing conditions on yield and quality of ground turmeric (*Curcuma longa* L.). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 45, n. 4, p. 423–429, dez. 2002.
- BERBERICH, T.; SAGOR, G. H. M.; KUSANO, T. Polyamines in Plant Stress Response. In: KUSANO, T.; SUZUKI, H. (Eds.). **Polyamines**. [s.l.] Springer Japan, 2015. p. 155–168.
- BERGQUIST, S. A. et al. Flavonoids in Baby Spinach (*Spinacia oleracea* L.): Changes during Plant Growth and Storage. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 53, p. 9459–9464, 2005.
- BHUIYAN, M. M. R. et al. Impact of multistoreyed agro-forestry systems on growth and yield of turmeric and ginger at Mymensingh, Bangladesh. **eSci Journal of Crop Production**, v. 1, n. 1, p. 19–23, 15 dez. 2012.
- BORSARI, M. et al. Curcuminoids as potential new iron-chelating agents: spectroscopic, polarographic and potentiometric study on their Fe(III) complexing ability. **Inorganica Chimica Acta**, v. 328, n. 1, p. 61–68, jan. 2002.
- CAMARGO, M. N.; KLAMT, E.; KAUFFMAN, J. H. **Classificação de solos usada em levantamentos pedológicos no Brasil**. Campinas: EMBRAPA-SNLCS, 1987.
- CHENG, S. et al. Molecular identification of phenylalanine ammonia-lyase as a substrate of a specific constitutively active Arabidopsis CDPK expressed in maize protoplasts. **FEBS Letters**, v. 503, n. 2-3, p. 185–188, 17 ago. 2001.
- COORAY, N. et al. Effect of maturity on some chemical constituents of turmeric (*Curcuma longa* L.). **J. Natn. Sci. Coun. Sri Lanka**, v. 16, n. 1, p. 39–51, 1988.
- DÍAZ, B. M. et al. Impact of ultraviolet-blocking plastic films on insect vectors of virus diseases infecting crisp lettuce. **HortScience**, v. 41, p. 711–716, 2006.
- DIXIT, D.; SRIVASTAVA, N. K. Partitioning of ¹⁴C-photosynthate of leaves in roots, rhizome, and in essential oil and curcumin in turmeric (*Curcuma longa* L.). **Photosynthetica**, v. 38, p. 275–280, 2000a.
- DIXIT, D.; SRIVASTAVA, N. K. Distribution of photosynthetically fixed ¹⁴CO₂ into curcumin and essential oil in relation to primary metabolites in developing turmeric (*Curcuma longa*) leaves. **Plant Science**, v. 152, p. 165–171, 2000b.
- ESATBEYOGLU, T. et al. Curcumin - vom Molekül zur biologischen Wirkung. **Angewandte Chemie**, v. 124, n. 22, p. 5402–5427, 29 maio 2012.
- FROHNMEYER, H.; STAIGER, D. Ultraviolet-B radiation-mediated responses in plants. Balancing damage and protection. **Plant physiology**, v. 133, n. 4, p. 1420–8, 1 dez. 2003.
- GARCÍA-MACÍAS, P. et al. Changes in the flavonoid and phenolic acid contents and antioxidant activity of red leaf lettuce (Lollo Rosso) due to cultivation under plastic films varying in ultraviolet transparency. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 10168–10172, 2007.
- GHASEMZADEH, A. et al. Effect of Different Light Intensities on Total Phenolics and

- Flavonoids Synthesis and Anti-oxidant Activities in Young Ginger Varieties (*Zingiber officinale* Roscoe). **International Journal of Molecular Sciences**, v. 11, p. 3885–3897, 2010.
- GILL, S. S.; TUTEJA, N. Polyamines and abiotic stress tolerance in plants. **Plant signaling & behavior**, v. 5, n. 1, p. 26–33, jan. 2010.
- GUPTA, S. C.; KISMALI, G.; AGGARWAL, B. B. Curcumin, a component of turmeric: from farm to pharmacy. **BioFactors (Oxford, England)**, v. 39, n. 1, p. 2–13, jan. 2013.
- HACKETT, W. P. Differential expression and functional significance of anthocyanins in relation to phasic development in *Hedera helix* L. **Advances in Botanical Research**, v. 37, p. 95–102, 2002.
- HERTWIG, I. VON. Curcuma. In: **Plantas medicinais e aromáticas**. São Paulo: Icone, 1986. p. 254–65.
- HORÁK, D. et al. Preparation and properties of magnetic nano- and micro-sized particles for biological and environmental separations. **Journal of separation science**, v. 30, n. 11, p. 1751–72, jul. 2007.
- HOSSAIN, M. A. et al. Effects of Relative Light Intensity on the Growth, Yield and Curcumin Content of Turmeric (*Curcuma longa* L.) in Okinawa, Japan. **Plant Production Science**, v. 12, p. 29–36, 2009.
- HOSSAIN, M. A. Effects of Harvest Time on Shoot Biomass and Yield of Turmeric (*Curcuma longa* L.) in Okinawa, Japan. v. 13, n. June 2009, 2010.
- HOSSAIN, M. A.; ISHIMINE, Y. Growth, Yield and Quality of Turmeric (*Curcuma longa* L.) Cultivated on Dark-red Soil, Gray Soil and Red Soil in Okinawa, Japan. **Plant Production Science**, v. 8, n. 4, p. 482–486, 22 dez. 2005.
- JANSEN, M. A. ; GABA, V.; GREENBERG, B. M. Higher plants and UV-B radiation: balancing damage, repair and acclimation. **Trends in Plant Science**, v. 3, n. 4, p. 131–135, 4 abr. 1998.
- JANSEN, M. A. K. et al. Plant stress and human health: Do human consumers benefit from UV-B acclimated crops? **Plant Science**, v. 175, n. 4, p. 449–458, out. 2008.
- JAYAPRAKASHA, G. K.; JAGAN MOHAN RAO, L.; SAKARIAH, K. K. Chemistry and biological activities of *C. longa*. **Trends in Food Science & Technology**, v. 16, n. 12, p. 533–548, dez. 2005.
- KANDIANNAN, K.; CHEMPAKAM, B.; KRISHNAMURTHY, K. Turmeric. In: PARTHASARATHY, V. A.; KANDIANNAN, K.; SRINIVASAN, V. (Eds.). . **Organic Spices**. 1. ed. [s.l.] New India Publishing, 2008. p. 387–438.
- KATSUYAMA, Y. et al. Curcuminoid biosynthesis by two type III polyketide synthases in the herb *Curcuma longa*. **The Journal of biological chemistry**, v. 284, n. 17, p. 11160–70, 24 abr. 2009.
- KITTS, D.; WEILER, K. Bioactive Proteins and Peptides from Food Sources. Applications of Bioprocesses used in Isolation and Recovery. **Current Pharmaceutical Design**, v. 9, n. 16, p. 1309–1323, 1 jun. 2003.
- KOLB, C. A. et al. UV screening by phenolics in berries of grapevine (*Vitis vinifera*). **Functional Plant Biology**, v. 30, p. 1177–1186, 2003.
- KRIZEK, D. T. et al. Inhibitory effects of ambient levels of solar UV-A and UV-B radiation of growth of cv. New Red Fire lettuce. **Physiologia Plantarum Plant.**, v. 103, n. 1, p. 1–7, maio 1998.
- KRUMBEIN, ANGELIKA, SAEGER-FINK HEIDI, S. I. Changes in quercetin and

kaempferol concentrations during broccoli head ontogeny in three broccoli cultivars. **Journal of applied botany and Food Quality**, v. 81, p. 136–139, 2007.

KULKARNI, S. J. et al. Extraction and purification of curcuminoids from Turmeric (*Curcuma longa* L.). p. 81–84, 2012.

KUMAR, B.; GILL, B. S. Effect of method of planting and harvesting time on growth, yield and quality of turmeric (*Curcuma longa* L.). **Journal of Spices and Aromatic Crops**, v. 18, n. 1, p. 22–27, 2009.

LARCHER, W. **Ecofisiologia vegetal**. São Carlos - SP: Rima, 2000.

LAVOLA, A. et al. Allocation of carbon to growth and secondary metabolites in birch seedlings under UV-B radiation and CO₂ exposure. **Physiologia Plantarum**, v. 109, n. 3, p. 260–267, 25 jul. 2000.

LI, S. et al. Chemical Composition and Product Quality Control of Turmeric (*Curcuma longa* L.). **Pharmaceutical Crops**, v. 2, p. 28–54, 2011.

LORENZI, H.; MATOS, F. DE A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. 2. ed. Nova Odessa: Plantarum, 2002.

LUTHRIA, D. L.; MUKHOPADHYAY, S.; KRIZEK, D. T. Content of total phenolics and phenolic acids in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) fruits as influenced by cultivar and solar UV radiation. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 19, p. 771–777, 2006.

LÜTZ, C. et al. Simulated solar irradiation with enhanced UV-B adjust plastid- and thylakoid-associated polyamine changes for UV-B protection. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1710, p. 24–33, 15 nov. 2005.

MACKAY, M. E. General Strategies for Nanoparticle Dispersion. **Science**, v. 311, n. 5768, p. 1740–1743, 24 mar. 2006.

MAGRO, M. et al. **Maghemite nanoparticles and method for preparing thereof**, 17 mar. 2012a. Disponível em: <<https://www.google.com/patents/US8980218>>. Acesso em: 19 nov. 2015

MAGRO, M. et al. Charge binding of rhodamine derivative to OH- stabilized nanomaghemite: universal nanocarrier for construction of magnetofluorescent biosensors. **Acta biomaterialia**, v. 8, n. 6, p. 2068–76, jul. 2012b.

MAGRO, M. et al. A magnetically drivable nanovehicle for curcumin with antioxidant capacity and MRI relaxation properties. **Chemistry (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)**, v. 20, n. 37, p. 11913–20, 8 set. 2014.

MAGRO, M. et al. Magnetic purification of curcumin from *Curcuma longa* rhizome by novel naked maghemite nanoparticles. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 63, n. 3, p. 912–20, 28 jan. 2015.

MAHESHWARI, R. K. et al. Multiple biological activities of curcumin: a short review. **Life sciences**, v. 78, n. 18, p. 2081–7, 27 mar. 2006.

MALLICK, N.; MOHN, F. H. Reactive oxygen species: response of algal cells. **Journal of Plant Physiology**, v. 157, n. 2, p. 183–193, ago. 2000.

MANHAS, S. S.; GILL, B. S. Effect of different cultural practices on production of turmeric (*Curcuma longa* L.) in Punjab. **Journal of Spices and Aromatic Crops**, v. 21, n. 1, p. 53–58, 2012.

MARCHESE, J. A. et al. Carbon isotope composition as a tool to control the quality of herbs and medicinal plants. **Photosynthetica**, v. 44, p. 155–159, 2006.

MARÍN, A. et al. Characterization and quantitation of antioxidant constituents of sweet pepper (*Capsicum annuum* L.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p.

3861–3869, 2004.

MIERZIAK, J.; KOSTYN, K.; KULMA, A. Flavonoids as Important Molecules of Plant Interactions with the Environment. **Molecules**, v. 19, p. 16240–16265, jan. 2014.

NAIR, K. P. P. The Botany of Turmeric. In: **The Agronomy and Economy of Turmeric and Ginger: the invaluable medicinal spice crops**. Amsterdam: Elsevier, 2013. p. 7–32.

PADMAPRIYA, S.; CHEZHIYAN, N.; SATHIYAMURTHY, V. A. Effect of shade and integrated nutrient management on biochemical constituents of turmeric (*Curcuma longa* L.). **Journal of Horticultural Sciences**, v. 2, n. 2, p. 123–129, 2007.

POTHITIRAT, W.; GRITSANAPAN, W. Variability of curcuminoids: anti-oxidative components in ethanolic turmeric extract determined by UV and HPLC methods. **Acta Horticulturae**, v. 786, p. 175–184, 2008.

PRASAD, S.; AGGARWAL, B. B. Turmeric - the Golden Spice. In: BENZIE, I.; WACHTEL-GALOR, S. (Eds.). **Herbal Medicine: Biomolecular and Clinical Aspects**. 2. ed. Boca Raton (FL): CRC Press, 2011.

SANTOS, H. G. et al. **Sistema brasileiro de classificação de solos**. 2. ed. Rio de Janeiro: Embrapa solos, 2006.

SCANDALIOS, J. G. Oxidative stress: Molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 38, p. 995–1014, 2005.

SFICHI, L.; LOANNIDIS, N.; KOTZABASIS, K. Thylakoid-associated Polyamines Adjust the UV-B Sensitivity of the Photosynthetic Apparatus by Means of Light-harvesting Complex II Changes. **Photochemistry and Photobiology**, v. 80, n. 3, p. 499–506, 30 abr. 2004.

SINGH, S.; PANDA, M. K.; NAYAK, S. Evaluation of genetic diversity in turmeric (*Curcuma longa* L.) using RAPD and ISSR markers. **Industrial Crops and Products**, v. 37, p. 284–291, maio 2012.

SINIGAGLIA, G. et al. Catalytically active bovine serum amine oxidase bound to fluorescent and magnetically drivable nanoparticles. **International journal of nanomedicine**, v. 7, p. 2249–59, jan. 2012.

SMITH, J.; BURRITT, D.; BANNISTER, P. Ultraviolet-B radiation leads to a reduction in free polyamines in *Phaseolus vulgaris* L. **Plant Growth Regulation**, v. 35, n. 3, p. 289–294, 2001.

SOLOVCHENKO, A.; SCHMITZ-EIBERGER, M. Significance of skin flavonoids for UV-B-protection in apple fruits. **Journal of Experimental Botany**, v. 54, n. 389, p. 1977–1984, 2003.

SRIKRISHNAH, S.; SUTHARSAN, S. Effect of Different Shade Levels on Growth and Tuber Yield of Turmeric (*Curcuma longa* L.) In the Batticaloa District of Sri Lanka. **American-Eurasian J. Agric. & Environ. Sci.**, v. 15, n. 5, p. 813–816, 2015.

SRIVASTAVA, N. K.; SHARMA, S.; MISRA, A. Influence of Zn on allocation of leaf-assimilated ¹⁴CO₂ into primary metabolites in relation to production of essential oil and curcumin in Turmeric (*Curcuma longa* L.). **World Journal of Agricultural Sciences**, v. 2, p. 201–207, 2006.

SURESH, D.; MANJUNATHA, H.; SRINIVASAN, K. Effect of heat processing of spices on the concentrations of their bioactive principles: Turmeric (*Curcuma longa*), red pepper (*Capsicum annum*) and black pepper (*Piper nigrum*). **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 20, n. 3-4, p. 346–351, maio 2007.

TAKAHASHI, S. et al. The solar action spectrum of photosystem II damage. **Plant**

physiology, v. 153, n. 3, p. 988–93, 1 jul. 2010.

TREUTTER, D. Managing Phenol Contents in Crop Plants by Phytochemical Farming and Breeding — Visions and Constraints. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 11, p. 807–857, 2010.

TROPICOS. **Tropicos.org** - **Curcuma longa L.** Disponível em: <<http://www.tropicos.org/Name/34500029>>. Acesso em: 6 jan. 2014.

TSORMPATSIDIS, E. et al. UV irradiance as a major influence on growth, development and secondary products of commercial importance in Lollo Rosso lettuce “Revolution” grown under polyethylene films. **Environmental and Experimental Botany**, v. 63, p. 232–239, 2008.

TURKOVÁ, J. **Affinity Chromatography**. 1. ed. Amsterdam, The Netherlands: Elsevier Scientific Publishing Company, 1978.

VALLEJO, F.; GARCÍA-VIGUERA, C.; TOMÁS-BARBERÁN, F. A. Changes in broccoli (*Brassica oleracea* L. Var. *italica*) health-promoting compounds with inflorescence development. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 51, p. 3776–3782, 2003.

VENERANDO, R. et al. Magnetic Nanoparticles with Covalently Bound Self-Assembled Protein Corona for Advanced Biomedical Applications. **The Journal of Physical Chemistry C**, v. 117, n. 39, p. 20320–20331, 3 out. 2013.

WANG, Y.; HU, W.; WANG, M. HPLC determination of three curcuminoid constituents in rhizoma *Curcumae*. **Acta Pharmaceutica Sinica**, 1999.

