



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

MARIANA ASSIS DE QUEIROZ CANCIAN

**POTENCIAL ANTIOXIDANTE E ANTIMICROBIANO DE
HIDROLISADO ENZIMÁTICO DE *CURCUMA LONGA* E
*PIPER NIGRUM***

Londrina
2017

MARIANA ASSIS DE QUEIROZ CANCIAN

**POTENCIAL ANTIOXIDANTE E ANTIMICROBIANO DE
HIDROLISADO ENZIMÁTICO DE *CURCUMA LONGA* E
*PIPER NIGRUM***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, nível Mestrado, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência de Alimentos.

Orientadora: Profa. Dra. Wilma Aparecida Spinosa

Coorientador: Profa. Dra. Thais de Souza Rocha

Londrina
2017

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Cancian, Mariana Assis de Queiroz .

Potencial antioxidante e antimicrobiano de hidrolisado enzimático de *Curcuma longa* e *Piper nigrum* / Mariana Assis de Queiroz Cancian. - Londrina, 2017.
76 f. : il.

Orientador: Wilma Aparecida Spinosa.

Coorientador: Thais de Souza Rocha.

Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, 2017.
Inclui bibliografia.

1. Hidrolisado enzimático - Tese. 2. Curcuma longa - Tese. 3. Piper nigrum - Tese. 4. Atividade Antioxidante - Tese. I. Spinosa, Wilma Aparecida . II. Rocha, Thais de Souza. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos. IV. Título.

MARIANA ASSIS DE QUEIROZ CANCIAN

**POTENCIAL ANTIOXIDANTE E ANTIMICROBIANO DE
HIDROLISADO ENZIMÁTICO DE *CURCUMA LONGA* E *PIPER
NIGRUM***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, nível Mestrado, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência de Alimentos.

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Profa. Dra. Wilma Aparecida Spinosa
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof. Dr. Regildo Márcio Gonçalves Da Silva
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita
Filho – UNESP

Prof.Dr. Gilberto Alves
Universidade Paranaense – UNIPAR

Londrina, 29 de maio de 2017.

À Deus, sempre em primeiro lugar.

Ao meu filho, Conrado, razão dos meus sorrisos.

A Geovana, por dividir todos os primeiros dias de sua vida com esse projeto.

Ao meu marido, Thiago, por ser sempre presente e por acreditar, dividir e viver minhas escolhas.

Aos meu Pais, Geraldo e Vani, e irmãs, Paula e Manuela, pelo incentivo e confiança.

À minha avó Geralda, pelo exemplo de vida.

Dedico.

AGRADECIMENTO

À Deus, por me dar força, sabedoria e guiar meus passos pelos melhores caminhos.

À Universidade Estadual de Londrina, pela infraestrutura e oportunidades de aprendizado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoa de Nível Superior (CAPES) pelo financiamento deste estudo.

A chefia, coordenação, docentes e profissionais do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Estadual de Londrina pelos ensinamentos e atenção.

À Profa. Dra. Wilma Spinosa, pela orientação, atenção, paciência e ensinamentos ao longo do desenvolvimento deste trabalho. Minha admiração, respeito e gratidão.

À Profa. Dra. Thais de Souza, pela coorientação, disposição, amizade e ensinamentos. Minha admiração, respeito e gratidão.

À Profa. Dra. Célia Maria Landi Franco, Prof. Dr. Márcio Schmiele e a aluna Mariana Souza Costa pelo suporte nas análises realizadas em São Paulo.

Aos doutorandos que em diferentes metodologias foram professores, Marcela Moreira Terhaag, Natália Niguma, Leonel Constantino e Lycio Shinji Watanabe. Obrigada por toda disposição e atenção, vocês foram essenciais no desenvolvimento deste trabalho.

À minha amiga de laboratório que se tornou amiga de vida, Marcela Moreira Terhaag, pela amizade, apoio, incentivo e sábias palavras. Foi realmente uma sorte encontrar alguém que vivesse as mesmas dificuldades e felicidades de ser mãe e esposa acadêmica.

Aos meus amigos de turma, que mesmo recente espero levar para a vida toda, Thamires Peixoto, André Ribeiro e Felipe Pedote, pela amizade e suporte durante todo o mestrado, vocês são fantásticos.

Aos meus amigos de laboratório Beto, Tainá, Rodrigo, Denise, Fernanda e Mate por facilitar e dividir as dificuldades do dia a dia, tornando esta jornada mais fácil.

As queridas estagiárias Tamara e Fernanda, por dividir metodologias, dúvidas e momentos de descontrações no dia a dia. E ao estagiário Matheus pelo trabalho desenvolvido.

Aos meus amados sogros, Solange e Polaco, pelo suporte no cuidado com o Conrado, ao cuidarem dele, cuidaram de mim também, e tornaram essa caminhada menos pesada. E a toda família Cancian, por sempre acreditarem em mim.

À minha avó Geralda, que sempre me cativou e me ensinou tanto com sua simplicidade e força.

À minha amada família Assis de Queiroz, pelo incentivo e apoio. Ao meu pai Geraldo por todo exemplo, amor e força, mesmo que distante. À minha mãe, Vani, pelos conselhos, compreensão e cuidado durante essa caminhada. A minha irmã Paula por dividir anseios e dar tantos conselhos durante os últimos dois anos. A minha irmã Manuela, que mesmo pequena, foi companheira e amiga.

Ao meu filho, Conrado, por me impulsionar na carreira acadêmica e entender todos os momentos de ausência. Por ser sempre minha motivação e por tornar meus dias mais felizes e completos. À minha pequena Geovana, que é tão esperada e mesmo assim já viveu comigo momentos únicos. Vocês sempre serão minha razão de viver!

Ao meu marido Thiago por toda paciência, amor, incentivo, apoio e confiança durante o mestrado. Por acreditar em mim, desde o processo seletivo até a última apresentação. E principalmente por dividir todos os momentos de sua vida comigo, sem dúvida, esse título também é seu.

MUITO OBRIGADA!

"Verba volant, scripta manent".
(Citação em latim que significa: "As palavras voam, os escritos permanecem").

QUEIROZ-CANCIAN, MARIANA ASSIS. **Potencial Antioxidante e Antimicrobiano de Hidrolisado Enzimático de *Curcuma longa* e *Piper nigrum***. 2017. 76 pgs. Dissertação (Mestrado em Ciência De Alimentos) – Universidade Estadual de Londrina, 2017.

RESUMO

Este estudo teve como objetivo desenvolver um hidrolisado com alto teor de açúcar, a base de *Curcuma longa* e *Piper nigrum* e avaliar suas propriedades antioxidantes e antimicrobiana. A composição química e a propriedade de pasta das matérias primas foram determinadas. Para extrair a curcumina e verificar sua capacidade antioxidante, os solventes etanol: água (80:20 v/v), metanol: água (80:20 v/v), acetona: água (80:20 v/v), água e ácido acético foram utilizados. O parâmetro tempo de hidrólise foi determinado por estudo cinético e a concentração enzimática de α -amilase e amiloglucosidase para as etapas de liquefação e sacarificação de hidrólise através de um Delineamento Central Composto Rotacional. Do hidrolisado a base de *Curcuma longa* e *Piper nigrum* foram determinados a morfologia das matrizes por microscopia eletrônica de varredura, a conformação tautomérica da curcumina por Infravermelho com Transformada de Fourier, a determinação de compostos polifenólicos e atividade antioxidante, por DPPH, ABTS e FRAP, e a atividade antimicrobiana, por macrodiluição. A farinha do rizoma de cúrcuma apresentou 59,23 g 100 g⁻¹ de amido e 4,18 g 100 g⁻¹ de curcumina. Os polifenólicos totais dos extratos obtidos foram verificados e a atividade antioxidante foi avaliada pelos métodos de DPPH, ABTS e FRAP. O teor de polifenólicos totais apresentou alta correlação ($0,85 \leq r \leq 0,94$) com as determinações antioxidantes, e sua maior extração foi obtida em extrato etanólico. O coeficiente de correlação entre o teor de polifenólicos totais e o teor de curcumina foi de apenas 0,67, o que sugere a presença de outros compostos polifenólicos nos extratos. O perfil de viscosidade da farinha do rizoma de cúrcuma e pimenta-do-reino indicou temperatura de pasta e de pico iguais a 74,25 °C e 91,5 °C, respectivamente. Através de delineamento experimental, obteve-se condições de hidrólise que resultaram em dextrose equivalente de 100%, destes 97,43% foram de glicose e 2,31% de maltose. As condições ideais para a hidrólise foram, para a etapa de liquefação, 95 °C, pH 6,03, 0,23 g de α -amilase 100 g⁻¹ de amido em 10 min; para a sacarificação as condições foram 60 °C, pH 4,50, 1,60 mL de amiloglucosidase 100 g⁻¹ de amido em 8 h. O hidrolisado a base de *Curcuma longa* e *Piper nigrum* em meio aquoso apresentou o mesmo teor de curcumina presente na cúrcuma, sugerindo que a hidrólise do amido permitiu a liberação deste composto de sua matriz. A avaliação do teor de polifenólicos totais e atividade antioxidante, observada pelos métodos DPPH e ABTS, do hidrolisado foi inferior à obtida na farinha do rizoma de cúrcuma. É possível que outros compostos polifenólicos da cúrcuma não tenham sido recuperados no hidrolisado. Já, através do método FRAP, a atividade antioxidante foi a mesma do extrato de cúrcuma, o que leva a crer que a curcumina seja o composto responsável pela redução do íon férrico. As linhagens bacterianas *S. aureus*, *B. cereus*, *E. coli*, *K. pneumonie*, *Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* Typhi e *P. aeruginosa* foram sensíveis ao extrato etanólico de cúrcuma e ao hidrolisado. Os resultados comprovaram a ação antioxidante e antimicrobiana hidrolisado enzimático obtido.

Palavras-chave: Curcumina. Piperina. Radicais Livres. DPPH. ABTS. FRAP.

QUEIROZ-CANCIAN, MARIANA ASSIS. **Antioxidant and antimicrobial potential of hydrolyzed enzymatic of *Curcuma longa* and *Piper nigrum***. 2017. 76 pgs. Dissertation (Master's degree in Food Science) – Londrina State University, Londrina, 2017.

ABSTRACT

This study aimed to develop a hydrolyzed material with high sugar content, made from *Curcuma longa* and *Piper nigrum*, and evaluated its antioxidant and antimicrobial properties. The chemical composition and the pasting properties were determined. The solvents ethanol:water (80:20 v/v), methanol:water (80:20 v/v), acetone:water (80:20 v/v), water and acetic acid were used to extract the curcumin and evaluate its antioxidant activity. The factor time of hydrolysis was determined by kinetic study and α -amylase and amyloglucosidase concentrations for liquefaction and saccharification were determined by a Central Composite Rotatable Design (CCRD). The morphology, by scanning electron microscopy, the tautomeric equilibrium of curcumin by Fourier transform infrared spectroscopy, determination of polyphenolic content, antioxidant activity, by DPPH, ABTS and FRAP, and antibacterial activity, by macrodilution were evaluated for the *Curcuma longa* and *Piper nigrum* hydrolyzed material. The turmeric rhizome flour showed 59.23 g 100 g⁻¹ of starch and 4.18 g 100 g⁻¹ of curcumin content. Total polyphenolics content in the obtained extracts were verified and antioxidant activity were evaluated by DPPH, ABTS, and FRAP methods. The total polyphenolics content showed strong correlation ($0.85 \leq r \leq 0.94$) with antioxidant determinations, and the ethanol extract was found to be the most effective. The correlation coefficient of total phenolic content and curcumin content was only 0.67, which suggests the presence of other phenolic compounds in the extracts. The viscosity profile of turmeric rhizome flour and black pepper showed pasting and peak temperatures equal to 74.25 °C and 91.5 °C, respectively. Through experimental design, it was obtained hydrolysis conditions that resulted in 100% dextrose equivalent, where 97.43% were glucose and 2.31% were maltose. The optimal hydrolysis conditions were, for liquefaction, 95 °C, pH 6.03, 0.23 g of α -amylase 100 g⁻¹ starch in 10 min; for saccharification the conditions were 60 °C, pH 4.50, 1.60 mL of amyloglucosidase 100 g⁻¹ starch in 8 h. The *Curcuma longa* and *Piper nigrum* hydrolyzed material in aqueous medium showed the same curcumin content present in the turmeric, it suggests that starch hydrolysis allowed the liberation of this compound from its matrix. The evaluation of total polyphenolics content and antioxidant activity, verified by DPPH and ABTS methods, of hydrolyzed material were lower than turmeric rhizome flour. It is possible that other phenolic compounds of turmeric had not been recovered in the hydrolyzed material. However, by FRAP method, the antioxidant activity was the same of the turmeric extract, leading to belief that curcumin is the compound responsible for the reduction of the ferric ion. The bacteria lineages, *S. aureus*, *B. cereus*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *Salmonella Enteritidis*, *Salmonella Typhi* and *P. aeruginosa*, studied were sensitive to the ethanolic extract of turmeric and to the hydrolyzed material. The results demonstrated the antioxidant and antimicrobial actions of the hydrolyzed material obtained.

Key words: Curcumin. Piperine. Free Radicals. DPPH. ABTS. FRAP.

ÍNDICE DE FIGURAS

INTRODUÇÃO GERAL

Figura 1 - Fluxograma da metodologia de trabalho para as matérias-primas farinha do rizoma de cúrcuma e pimenta-do-reino	18
Figura 2 - Fluxograma da metodologia de trabalho para o hidrolisado de cúrcuma e pimenta-do-reino.	19
Figura 3 - Fluxograma da metodologia de trabalho para a farinha do rizoma de cúrcuma e o produto hidrolisado de cúrcuma e pimenta-do-reino.	20

CAPÍTULO 1

Figura 1 - Estrutura da amilose polímero linear composto por D-glicoses unidas em α -(1-4) (a) e Estrutura da amilopectina polímero ramificado composto por D-glicoses unidas em α -(1-4) e α -(1-6) (b)	24
Figura 2 - Fórmula estrutural da curcumina (a) e estrutura química de seu equilíbrio ceto-enólico (b)	25
Figura 3 - Estrutura da Piperina	28

CAPÍTULO 2

Figura 1 - Espectro de varredura UV-Vis para diferentes extratos de curcumina: (a) Etanol 800 mL.L-1; (b) Metanol 800 mL.L-1; (c) Acetona 800 mL.L-1; (d) Ácido acético 1000 mL.L-1; (e) Água.	50
Figura 2 - Perfil amilográfico da pasta da farinha de rizoma de cúrcuma e pimenta-do-reino.	54
Figura 3 - Perda de viscosidade durante a etapa de liquefação.	55
Figura 4 - Superfície de resposta 3D (A) e curvas de contorno 2D (B) para o teor de dextrose equivalente (DE) em função da concentração de enzima em relação ao substrato (amido de cúrcuma) para α -amilase e amiloglicosidase.	60
Figura 5 - Cromatograma de eluição dos açúcares contidos no hidrolisado de cúrcuma e pimenta-do-reino.	62
Figura 6 - Micrografias eletrônicas da farinha de cúrcuma in natura e do hidrolisado de cúrcuma e pimenta-do-reino. a: cúrcuma in natura em 800 x. b: cúrcuma in natura em 3000 x. c: hidrolisado de cúrcuma e pimenta-do-reino em 800 x. d: hidrolisado de cúrcuma e pimenta-do-reino em 3000 x.	63

Figura 7 - Espectro de FTIR de (i) farinha de rizoma de cúrcuma e (ii) hidrolisado de cúrcuma e pimenta-do-reino.....64

ÍNDICE DE TABELAS

CAPÍTULO 2

Tabela 1 - Atividade antioxidante pelas metodologias DPPH, ABTS e FRAP, Polifenólicos Totais, pH e quantificação de curcumina por CLAE obtidos nos diferentes solventes de extração.	51
Tabela 2 – Coeficientes de correlação de Pearson para atividade antioxidante pelas metodologias DPPH, ABTS e FRAP, determinação de compostos Polifenólicos Totais e quantificação de curcumina por CLAE.	52
Tabela 3 - Propriedades de pasta da farinha de rizoma de cúrcuma e pimenta-do-reino.	53
Tabela 4 - Teor de dextrose equivalente (DE) em diferentes tempos da etapa de sacarificação	57
Tabela 5 - Matriz do delineamento experimental para otimização da concentração enzimática na hidrólise e teores de DE obtidos.....	58
Tabela 6 - ANOVA para os teores de DE obtidos na otimização da concentração enzimática na hidrólise.	59
Tabela 7 - Proporção de açúcares obtidos no hidrolisado de cúrcuma e pimenta do reino.	61
Tabela 8 - Atividade antioxidante pelas metodologias DPPH, ABTS, FRAP, determinação de Polifenólicos Totais e quantificação de curcumina por CLAE do rizoma de cúrcuma, pimenta-do-reino e hidrolisado de cúrcuma e pimenta-do-reino.	65
Tabela 9 - Concentração Mínima Inibitória (CMI) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) ($\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) de extrato etanólico da farinha de rizoma de cúrcuma e do hidrolisado de cúrcuma e pimenta-do-reino.	67

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AACC	<i>American Association of Cereal Chemists</i>
ABTS	2,2-azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic
AMG	Amiloglucosidase
ANOVA	Análise de Variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AOAC	<i>Association of Official Analytical Chemists</i>
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CMB	Concentração Mínima Bactericida
DCCR	Delineamento Central Composto Rotacional
DE	Dextrose Equivalente
DMSO	Dimetil Sulfóxido
DP	Desvio Padrão
ERO	Espécie reativa de oxigênio
ET	Equivalente em Trolox
FAO	Organizações das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação
FDA	Food and Drug Administration
FRAP	Ferric Reducing Antioxidant Power
FTIR	Espectrometria Infravermelho com Transformada de Fourier
GRAS	Geralmente Reconhecido como Seguro
IDA	Ingestão Diária Aceitável
INS	Sistema Internacional de Numeração de Aditivos Alimentares
ISI	Instituto Internacional do Amido
JECFA	<i>Joint Expert Committee in Food Additives</i>
LACEN	Laboratórios Centrais de Saúde Pública
LMUEL	Laboratório de Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina
PTFE	Politetrafluoretileno
PVDF	Fluoreto de polivinilideno
TPTZ	2,4,6-tripiridil -s- triazina
UV-Vis	Espectroscopia no Ultravioleta Visível

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO GERAL.....	15
2.	OBJETIVOS.....	17
2.1.	OBJETIVO GERAL.....	17
2.2.	OBJETIVO ESPECÍFICO.....	17
3.	METODOLOGIA DE TRABALHO.....	18
4.	REFERÊNCIAS.....	21
	CAPÍTULO 1- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	22
1.	CÚRCUMA.....	22
1.1	<i>Amido de Cúrcuma.....</i>	<i>23</i>
1.2	<i>Curcumina.....</i>	<i>25</i>
2.	PIMENTA-DO-REINO.....	27
2.1	<i>Piperina.....</i>	<i>27</i>
3.	HIDRÓLISE ENZIMÁTICA.....	28
4.	ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	30
5.	ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	32
6.	REFERÊNCIAS.....	33
	CAPÍTULO 2 – HIDROLISADO ENZIMÁTICO COM ALTO TEOR DE GLICOSE, A BASE DE CURCUMA LONGA E PIPER NIGRUM, APRESENTA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E ANTIMICROBIANA.....	39
	RESUMO.....	39
1.	INTRODUÇÃO.....	39
2.	MATERIAL E MÉTODOS.....	41
2.1.	<i>Material.....</i>	<i>41</i>
2.2.	<i>Composição Físico Química.....</i>	<i>41</i>
2.3.	<i>Propriedade da pasta do Amido da farinha de rizoma de cúrcuma com Pimenta-do-Reino.....</i>	<i>42</i>
2.4.	<i>Hidrólise Enzimática.....</i>	<i>42</i>
2.4.1.	<i>Determinação do Tempo de Liquefação e Sacarificação.....</i>	<i>42</i>
2.4.2.	<i>Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR).....</i>	<i>43</i>

2.4.3. Perfil dos açúcares obtidos na hidrólise por Cromatografia de troca aniônica de alta eficiência.....	43
2.5. Extração e Quantificação de Curcumina	44
2.6. Determinação de compostos polifenólicos e Atividade Antioxidante	45
2.6.1. Determinação de compostos polifenólicos totais.....	45
2.6.2. Ensaio pelo método DPPH.....	46
2.6.3. Capacidade de sequestro de radical livre estável ABTS	46
2.6.4. Método de redução de íons de ferro (FRAP).....	46
2.7. Microscopia Eletrônica de Varredura.....	47
2.8. Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)	47
2.9. Atividade Antimicrobiana	47
2.9.1. Preparo dos Inóculos Bacterianos.....	47
2.9.2. Obtenção dos Extratos	48
2.9.3. Concentração Mínima Inibitória (CMI).....	48
2.9.4. Concentração Bactericida Mínima (CBM).....	48
2.10. Análise Estatística	49
3. RESULTADOS E DISCUSSÕES	49
3.1. Composição Físico Química.....	49
3.2. Extração de Curcumina em diferentes solventes	50
3.3. Propriedade da Pasta do Amido da farinha de rizoma de cúrcuma com Pimenta-do-Reino.....	53
3.4. Hidrólise enzimática.....	55
3.4.1. Determinação do Tempo de Liquefação e Sacarificação	55
3.4.2. Otimização da concentração enzimática na hidrólise.....	57
3.4.3. Perfil dos açúcares obtidos na hidrólise de cúrcuma com pimenta-do-reino.....	61
3.5. Morfologia da farinha de rizoma de cúrcuma e do hidrolisado de cúrcuma e pimenta-do-reino.....	62
3.6. Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)	63
3.7. Atividade Antioxidante	65
3.8. Atividade Antimicrobiana: Concentração Mínima Inibitória (CMI) e Concentração Bactericida Mínima (CBM).....	66
4. CONCLUSÃO	68
5. REFERÊNCIAS	70
CONSIDERAÇÕES FINAIS	76

1. INTRODUÇÃO GERAL

A *Curcuma longa* L., conhecida como cúrcuma ou açafrão, é uma planta cujo interesse econômico e alimentar tem-se no seu rizoma. Dentre os constituintes de sua composição química, a cúrcuma tem em maior proporção o amido e em menor quantidade proteínas, lipídeos e fibras, além dos metabólitos secundários, como os pigmentos curcuminoídeos e os óleos essenciais (MANIGLIA, et al., 2015). As plantas, assim como a cúrcuma, são fontes de substâncias fitoquímicas como polifenóis, flavonóides, taninos e outros metabólitos secundários. Tais substâncias apresentam propriedades funcionais de benefício à saúde (NEGI, 2012; KASOTE, et al., 2015) e são chamadas de compostos bioativos, que podem ser usados nas dietas alimentares.

O rizoma de cúrcuma (*Curcuma longa* L.) vem despertando grande interesse científico devido às diversas propriedades biológicas da cúrcuma como atividade anti-inflamatória, anticancerígena, antimicrobiana e antioxidante com atribuição principal destas atividades aos pigmentos curcuminoídeos, em especial à curcumina (GANGWAR, et al., 2013; PRASAD, et al., 2014; GUPTA, et al., 2015; WANG, et al., 2015). Os antioxidantes são substâncias que, presentes em concentrações baixas comparadas ao substrato oxidável, retardam significativamente ou inibem a oxidação do substrato (LÓPEZ-ALARCÓN; DENICOLA, 2013). A atividade antimicrobiana é a capacidade de causar dano a um microrganismo, eliminando-o ou impedindo sua multiplicação. Pesquisas para avaliar a atividade antimicrobiana podem ser realizadas por meio de estudos com microrganismos que causam intoxicação alimentar (agentes infecciosos e produtores de toxinas) e microrganismos deteriorados, como o *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* (DAVIDSON, TAYLOR; SCHMIDT, 2013; CHAKRABORTY et al., 2014).

Apesar do alto interesse científico, a curcumina apresenta baixa biodisponibilidade o que limita sua absorção no organismo e gera rápida eliminação sistêmica (SUETH-SANTIAGO, et al., 2015). Estudos apontam que a biodisponibilidade da curcumina pode ser melhorada através do uso da piperina, que é principal composto ativo das pimentas-do-reino (*Piper nigrum* Linn) (SHOBA et al., 1997; KASIBHATTA; NAIDU, 2007). Shoba et al. (1997) observaram em estudos in vivo o aumento de 2000% na biodisponibilidade celular da curcumina quando

administrada concomitantemente com a piperina na proporção de 1:0,01 curcumina:piperina.

O presente trabalho teve por objetivo desenvolver um hidrolisado por via enzimática de cúrcuma adicionado de pimenta-do-reino. Além disso, objetivou-se avaliar a atividade antioxidante e a atividade antimicrobiana *in vitro* do rizoma de cúrcuma e do hidrolisado desenvolvido.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Produzir um hidrolisado enzimático, a partir da farinha de rizoma de cúrcuma com pimenta-do-reino, com alto teor de dextrose equivalente e avaliar suas atividades antioxidante e antimicrobiana.

2.2. OBJETIVO ESPECÍFICO

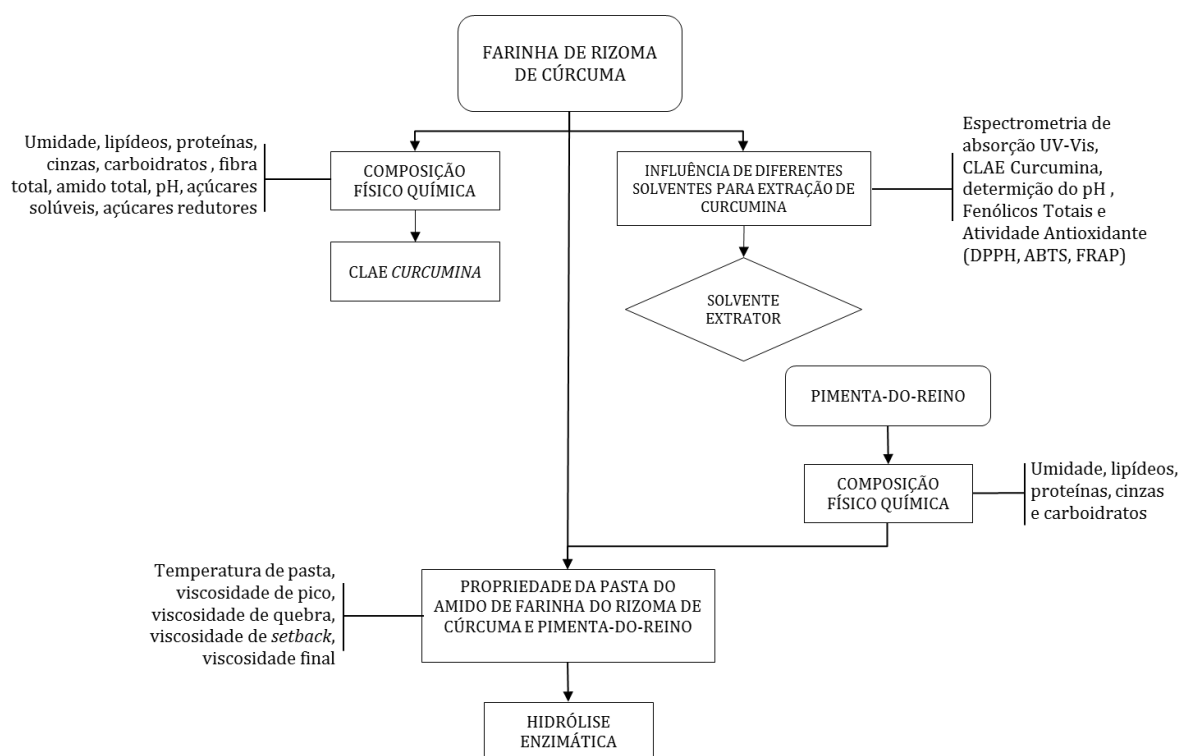
- Determinar o melhor solvente extrator de curcumina para determinação de polifenólicos totais, análises de atividade antioxidante, por meio dos testes DPPH, ABTS e FRAP, e atividade antimicrobiana;
- Definir as propriedades de pasta do amido da farinha de rizoma de cúrcuma e pimenta-do-reino;
- Definir os parâmetros, tempo e concentração enzimática de α -amilase e amiloglucosidase para as etapas do processo de hidrólise enzimática da farinha de rizoma de cúrcuma e de pimenta-do-reino;
- Verificar os açúcares gerados no processo de hidrólise enzimática da farinha de rizoma de cúrcuma e de pimenta-do-reino;
- Verificar a conformação tautomérica da molécula de curcumina presente na farinha de rizoma de cúrcuma e no hidrolisado de cúrcuma e pimenta-do-reino;
- Avaliar *in vitro* a atividade antioxidante dos extratos do na farinha de rizoma de cúrcuma e do hidrolisado de cúrcuma e pimenta-do-reino pelos métodos DPPH, ABTS, FRAP e determinar o teor de polifenólicos totais;
- Avaliar *in vitro* a atividade antimicrobiana do farinha de rizoma de cúrcuma e do hidrolisado de cúrcuma e pimenta-do-reino por Concentração Inibitória Mínima e Concentração Mínima Bactericida pela metodologia de macrodiluição em caldo e contagem em placas em meio sólido;

3. METODOLOGIA DE TRABALHO

Os estudos foram desenvolvidos nos laboratórios de pesquisa do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, laboratório de Desenvolvimento de Instrumentação e Automação Analítica, Laboratório de Espectroscopia e Laboratório de Microscopia Eletrônica e de Microanálise da Universidade Estadual de Londrina (Londrina, PR) e no laboratório de Amido e Panificação da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (São José do Rio Preto, SP).

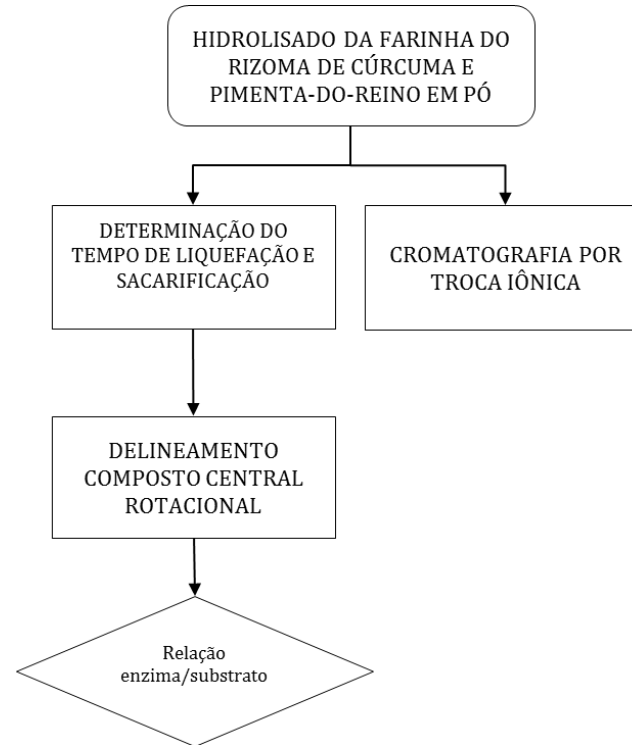
Os fluxogramas abaixo ilustram a metodologia de trabalho para à obtenção do hidrolisado de cúrcuma e pimenta-do-reino. Todos os métodos foram descritos no item Material e Métodos do Capítulo 2. Esta dissertação for organizada em capítulos, no Capítulo 1 encontra-se uma meticulosa e atual revisão bibliográfica sobre o assunto em estudo. No Capítulo 2, os resultados obtidos foram organizados em forma de artigo que será submetido à Revista *Food Chemistry*.

Figura 1 - Fluxograma da metodologia de trabalho para as matérias-primas farinha do rizoma de cúrcuma e pimenta-do-reino.



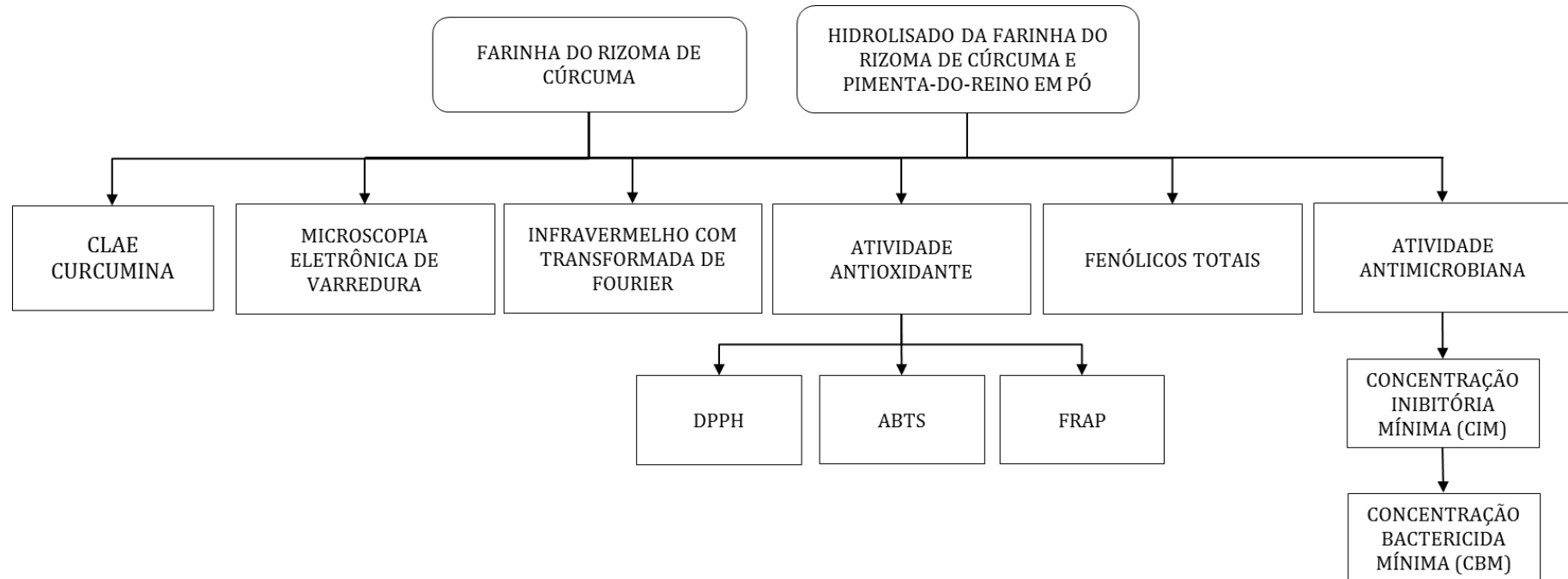
Fonte: o próprio autor.

Figura 2 - Fluxograma da metodologia de trabalho para o hidrolisado de cúrcuma e pimenta-do-reino.



Fonte: o próprio autor.

Figura 3 - Fluxograma da metodologia de trabalho para a farinha do rizoma de cúrcuma e o produto hidrolisado de cúrcuma e pimenta-do-reino.



Fonte: o próprio autor.

4. REFERÊNCIAS

CHAKRABORTY, Biswajit et al. Bactericidal activity of selected medicinal plants against multidrug resistant bacterial strains from clinical isolates. **Asian Pacific journal of tropical medicine**, v. 7, p. S435-S441, 2014.

DAVIDSON, P. Michael; TAYLOR, T. Matthew; SCHMIDT, Shannon E. Chemical preservatives and natural antimicrobial compounds. In: **Food microbiology**. American Society of Microbiology, 2013. p. 765-801.

GANGWAR, Rajesh K. et al. Curcumin conjugated silica nanoparticles for improving bioavailability and its anticancer applications. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 61, n. 40, p. 9632-9637, 2013.

GUPTA, Ankur; MAHAJAN, Surabhi; SHARMA, Rajendra. Evaluation of antimicrobial activity of Curcuma longa rhizome extract against Staphylococcus aureus. **Biotechnology reports**, v. 6, p. 51-55, 2015.

KASIBHATTA, Ravisekhar; NAIDU, M. U. R. Influence of piperine on the pharmacokinetics of nevirapine under fasting conditions. **Drugs in R ; D**, v. 8, n. 6, p. 383-391, 2007.

KASOTE, Deepak M. et al. Significance of antioxidant potential of plants and its relevance to therapeutic applications. **International journal of biological sciences**, v. 11, n. 8, p. 982, 2015.

LÓPEZ-ALARCÓN, Camilo; DENICOLA, Ana. Evaluating the antioxidant capacity of natural products: A review on chemical and cellular-based assays. **Analytica chimica acta**, v. 763, p. 1-10, 2013.

MANIGLIA, B. C. et al. Turmeric dye extraction residue for use in bioactive film production: Optimization of turmeric film plasticized with glycerol. **LWT-Food Science and Technology**, v. 64, n. 2, p. 1187-1195, 2015.

NEGI, Pradeep Singh. Plant extracts for the control of bacterial growth: Efficacy, stability and safety issues for food application. **International Journal of Food Microbiology**, v. 156, n. 1, p. 7-17, 2012.

PRASAD, Sahdeo et al. Curcumin, a component of golden spice: from bedside to bench and back. **Biotechnology advances**, v. 32, n. 6, p. 1053-1064, 2014.

SHOBA, Guido et al. Influence of piperine on the pharmacokinetics of curcumin in animals and human volunteers. **Planta medica**, v. 64, n. 04, p. 353-356, 1998.

SUETH-SANTIAGO, V. et al. Curcumina, o pó dourado do açafão-da-terra: introspecções sobre química e atividades biológicas. **Química Nova**, v. 38, n. 4, p. 538-552, 2015.

WANG, Jiao et al. Anti-inflammatory activity of curcumin-loaded solid lipid nanoparticles in IL-1 β transgenic mice subjected to the lipopolysaccharide-induced sepsis. **Biomaterials**, v. 53, p. 475-483, 2015.

CAPÍTULO 1- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. CÚRCUMA

Curcuma longa L. é uma planta herbácea, perene, de pequeno porte pertencente à família *Zingiberaceae*. No Brasil, é conhecida popularmente como cúrcuma ou açafrão e no mercado internacional como *turmeric*. De acordo com a Farmacopéia Brasileira o vegetal é constituído por rizomas secos, parte utilizada da planta e de interesse econômico, e suas características sensoriais são odor fracamente aromático e sabor picante, levemente amargo (ANVISA, 2010). Planta originária do sudeste asiático e subcontinente indiano é extensivamente cultivada na China, Índia, Indonésia e Tailândia. A produção brasileira de cúrcuma ocorre em quase todas as regiões do país sendo os estados de São Paulo, Minas Gerais e Goiás os maiores produtores (BERNI et al., 2014).

No Brasil, a aplicação da cúrcuma em alimentos é como aditivo alimentar (INS 100i), no Compêndio da legislação brasileira de aditivos alimentares, a cúrcuma (ou em alguns casos a curcumina) aparece como corante de diversos alimentos, entre eles queijos, iogurte, bala, goma de mascar, gelatinas, vinhos, conservas cárneas, produtos de panificação, sopas, sorvete, mostarda, manteiga, biscoitos e maionese (ANVISA, 2017). Tradicionalmente, a cúrcuma é usada em formulações de pratos típicos da Índia e países asiáticos, principalmente no *curry* indiano. De acordo com a Organizações das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação (FAO) a sua Ingestão Diária Aceitável (IDA) é estabelecida em 0 – 3 mg/kg peso corpóreo e é restringida a corante natural (FAO, 2003; ANVISA, 2017).

A composição química da cúrcuma é influenciada por fatores como planta matriz, tipo de solo, clima, adubação, disponibilidade hídrica, época de colheita e tempo de armazenamento (SCARTEZZINI; SPERONI, 2000). Valores da composição centesimal do rizoma fresco, obtidos de diferentes estudos determinaram que o maior constituinte é o amido (19 a 50%), seguido de proteínas (6 a 12%), fibras (1 a 10%) e cinzas (2 a 11%). Os rizomas secos contêm óleo essencial (2,5 a 5%), curcumina (0,02 a 10,90%) e apresentam de 25 a 70% de amido (ESATBEYOGLU, et al., 2012; JHA, et al., 2015; SUETH-SANTIAGO, et al., 2015; MANIGLIA, et al., 2015).

Os produtos de cúrcuma disponíveis mundialmente são três: a farinha do rizoma de cúrcuma, a oleoresina de cúrcuma e o extrato de curcumina. A farinha

de cúrcuma, aplicado em produtos onde seu aroma é desejável, consiste em raízes secas e moídas. A oleoresina da cúrcuma tem como função predominante colorir, ela é obtida por extração com solventes do pó de cúrcuma, com rendimento de cerca de 12% e apresenta teores de 30 a 40% de pigmentos expressos em curcumina e 15 a 25% de óleo volátil. O extrato de curcumina é o corante sem aroma ou sabor residual, obtido por extração com solventes do pó de cúrcuma seco (PEREIRA; STRINGHETA, 1998).

Na Índia, a cúrcuma, que é utilizada na alimentação diária sob a forma de especiaria, também é utilizada na medicina tradicional para o tratamento de vários tipos de doenças (BARANKEVICZ, 2015). Na prática *ayurvédica* (sistema medicinal popular da Índia), a cúrcuma é utilizada pelas suas ações digestivas, imunizante, antialérgica, antimicrobiana, estimulante, anti-inflamatória, cicatrizante, antioxidante, ou ainda pela sua atuação em doenças respiratórias (asma, bronquites e alergias) e em outros transtornos, como anorexia, doenças hepáticas e sinusite (SUETH-SANTIAGO et al., 2015).

A coloração amarelada da cúrcuma é devido a presença de compostos polifenólicos denominados curcuminoides. Os pigmentos curcuminoides são três: a curcumina, a demetoxicurcumina e a bisdemetoxicurcumina. Dentre eles, a curcumina tem sido considerado como a principal classe de metabólito responsável pelas propriedades biológicas do rizoma da cúrcuma (PRIYADARSINI, 2009). Diferentes estudos comprovam suas atividades biológicas como efeito antioxidante, anti-inflamatório, anti-câncer e antimicrobiano (PRASAD, et al., 2014; WANG, et al., 2015; GANGWAR, et al., 2013; GUPTA, et al., 2015;).

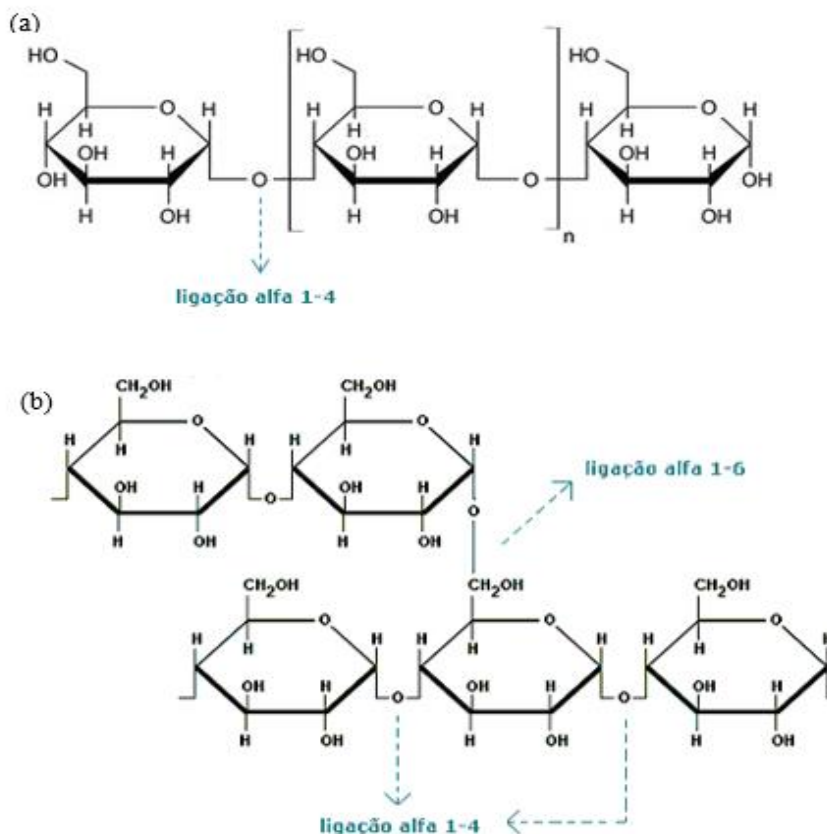
1.1 AMIDO DE CÚRCUMA

O amido é a fonte de reserva mais importante dos vegetais e na dieta humana é a principal fonte de carboidrato. Sua diversidade em matérias-primas apresenta em comum alta disponibilidade, baixo preço e como características importantes ser fonte renovável, biodegradável, e não ser tóxica (MANIGLIA, 2012). A produção mundial de amidos em 2015 foi estimada em 85 milhões de toneladas (ISI, 2016).

Quimicamente, o amido é um homopolissacarídeo constituído por uma mistura de dois polissacarídeos: amilose e amilopectina, em proporções que variam com a espécie procedente e grau de maturação do vegetal. A amilose é uma

molécula essencialmente linear formada por unidades D-glicose ligadas em α -1,4 e a amilopectina é uma molécula altamente ramificada e consiste em cadeias de unidades de D-glicose unidas com ligações α -1,4 e α -1,6 nos pontos de ramificação (Figura 1) (LEAL, NETO, 2013).

Figura 1 - Estrutura da amilose [polímero linear composto por D-glicoses unidas em α -1,4] e Estrutura da amilopectina [polímero ramificado composto por D-glicoses unidas em α -1,4 e α -1,6] (a) e (b) respectivamente.



Fonte: Adaptado de MORAES, (2009).

A cúrcuma não tem expressão na indústria como fonte de amido, a extração da fécula é considerada uma atividade secundária, sendo os rizomas usados principalmente para obtenção de corante e em uso direto na culinária. O interesse no resíduo da extração de óleos essenciais e corantes da cúrcuma é crescente, uma vez que a possibilidade de aproveitamento do mesmo gera um subproduto com alto teor de amido (LEONEL, 2007). Portanto, devido ao elevado teor de amido e ao fato do processo de extração não interferir na obtenção dos produtos comerciais, este rizoma pode ser promissor como uma matéria-prima para a indústria de amido (LEONEL; CEREDA, 2002), seja na forma de subproduto ou na forma íntegra do rizoma.

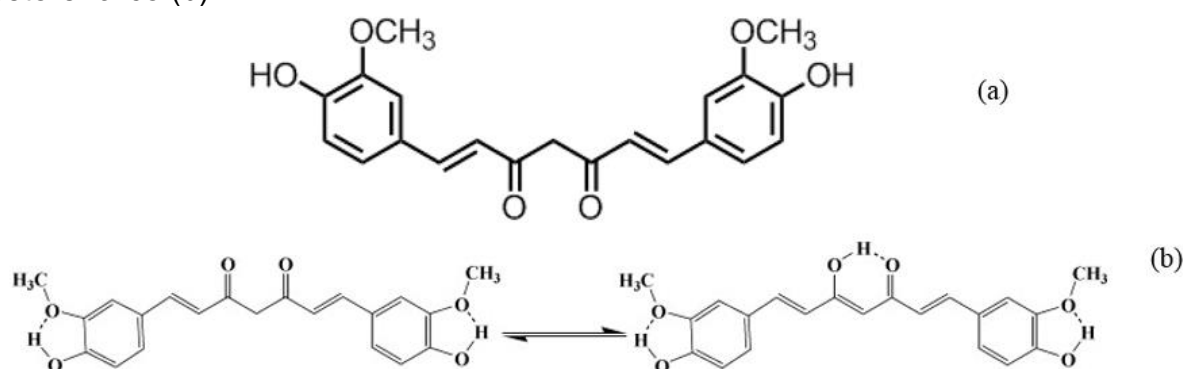
O amido de cúrcuma pode conter vestígios de oleorresina e curcuminoides resultando em uma coloração amarelada. Estes compostos

apresentam atividades antioxidantes e, portanto, podem ser classificados como um amido especial com alto potencial comercial (JYOTHI; MOORTHY; VIMALA, 2003; BRAGA et al., 2006).

1.2 CURCUMINA

A farinha de cúrcuma pode conter de 0,02 a 10,9% do peso seco em curcumina (GÖREN, et al., 2009; ESATBEYOGLU et al., 2012). A estrutura química da molécula de curcumina (Figura 2-a) consiste em dois anéis aromáticos, contendo um radical metoxi e um grupamento hidroxila, interconectados simetricamente em conjugação por uma fração β -dicetona (SAHNE, et al., 2017). Essa porção da molécula é responsável pela transferência intramolecular do átomo de hidrogênio, o que permite a curcumina exibir um tautomerismo ceto-enólico (Figura 2-b). O equilíbrio ceto-enólico é parcialmente dependente da polaridade e do valor de pH do solvente, que assume preferencialmente, o sentido enol em razão da presença de uma ligação de hidrogênio intramolecular e de uma maior planaridade molecular. Em solventes não polares, a curcumina existe na forma de enol, por causa da formação de ligação de hidrogênio intramolecular, enquanto que em solventes polares existe na forma dicetônica (ESATBEYOGLU, et al., 2012; JHA, et al., 2015; SUETH-SANTIAGO, et al., 2015).

Figura 2 - Fórmula estrutural da curcumina (a) e estrutura química de seu equilíbrio ceto-enólico (b).



Fonte: PRIYADARSINI, 2009

A curcumina isolada está disponível comercialmente como uma mistura dos três componentes: curcumina (77%), desmetoxicurcumina (17%), e bisdesmetoxicurcumina (3%) (SUETH-SANTIAGO, et al., 2015).

A curcumina é um fitoquímico polifenólico que apresenta baixa solubilidade aquosa em pH 7 e é solúvel em solventes como dimetilsulfóxido, acetona, nos álcoois metílico e etílico e ácido acético (PRIYADARSINI, 2009). A curcumina e os compostos curcuminoídeos são estáveis em meios ácidos e temperaturas altas, mas a partir de 100 °C há degradação. Outro fator determinante para a degradação da curcumina é a exposição à luz (KIAMAHALLEH, et al., 2016).

A curcumina possui coloração amarelo brilhante, e em solução apresenta forte absorção na região UV-Vis com absorção máxima na faixa de 408 a 434 nm, dependendo do solvente utilizado. Assim, ao se modificar a polaridade do solvente há uma alteração no comprimento de onda de máxima absorção ($\lambda_{\text{máx}}$) da curcumina (PRIYADARSINI, 2009).

A curcumina possui uma série de efeitos na prevenção e no tratamento do câncer. Vários estudos indicam que a curcumina é um potente agente quimiopreventivo, inibindo tanto a iniciação como a propagação de vários tipos de tumores. Já foram descritas atividades antiproliferativas sobre os tumores de cólon (SHARMA et al., 2001), de fígado (CHUANG et al., 2000), de pele (HUANG et al., 2005) e de pâncreas (LEV-ARI et al., 2006).

Em várias doenças crônicas, em que a inflamação é conhecida por desempenhar um papel importante, a curcumina tem demonstrado efetividade terapêutica. Estas doenças incluem o Alzheimer (CHONPATHOMPIKUNLERT et al., 2010), a esclerose múltipla (NATARAJAN; BRIGHT, 2002), a epilepsia (SUMANONT et al., 2006), diabetes tipo 2 (NISHIYAMA et al., 2005), a asma (RAM; DAS; GHOSH, 2003) e a AIDS (Síndrome da Imunodeficiência Adquirida) (BALASUBRAMANYAM et al., 2004).

Estudos desenvolvidos em modelos animais e humanos (CHENG et al., 2001; LAO et al., 2006), comprovaram que a ingestão da curcumina não apresenta níveis tóxicos, mesmo em doses de 8g por dia, e é classificado pela *Food and Drug Administration* (FDA) como Geralmente Reconhecido como Seguro (GRAS). No entanto, apesar de seus efeitos farmacológicos promissores e segurança, a curcumina não tem sido amplamente usada como agente terapêutico, devida a baixa biodisponibilidade.

A curcumina apresenta baixa absorção intestinal, devida a limitada solubilidade em água, rápido metabolismo hepático e eliminação sistêmica. A molécula apresenta sítios lábeis ao metabolismo, o que faz com que a mesma sofra

metabolismo hepático de primeira passagem (PRIYADARSINI, 2009; ESATBEYOGLU, et al., 2012).

Diferentes métodos têm sido propostos para melhorar a biodisponibilidade da curcumina. A curcumina pode ter sua solubilidade aumentada quando complexada com íons metálicos e pelo uso de encapsulação. Uma outra estratégia é a coadministração com piperina, um composto bioativo encontrado na pimenta-do-reino que inibe a eliminação sistêmica da curcumina por glucoronidação hepática e intestinal (SUETH-SANTIAGO, et al., 2015).

2. PIMENTA-DO-REINO

Pimenta-do-reino (*Piper nigrum* Linn), da família Piperaceae, é uma especiaria popular nos países orientais. Originária da Índia, tem um sabor acre, pungente e picante e seu cultivo se estende às áreas tropicais e subtropicais do globo. Seu uso é observado em diferentes propósitos como na dieta humana, na medicina e como agente de biocontrole. Dentre as espécies mais conhecidas, consumidas e produzidas de pimenta em nível mundial está a pimenta preta (*Piper nigrum* L.), conhecida popularmente como pimenta-do-reino no Brasil. A pimenta-do-reino é a especiaria mais importante e comercializada no mundo. O Brasil é o 3º maior produtor mundial da pimenta, no período entre 1961 a 2014, conforme dados da FAO (2017). A pimenta-do-reino é rica em ácidos polifenólicos e compostos antioxidantes. Dentre estes compostos, a piperina é conhecida por proporcionar efeitos fisiológicos benéficos (AHMAD, et al., 2012).

2.1 PIPERINA

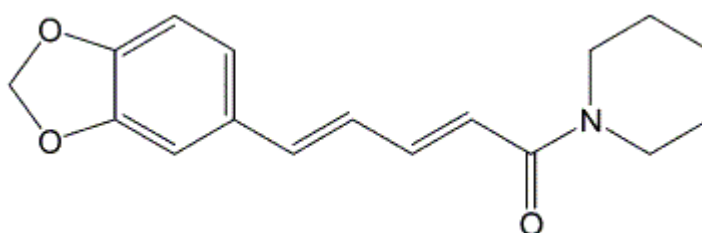
Piperina (1-piperoil piperidine - Figura 3), principal alcalóide e maior componente dos metabólitos secundários das pimentas pretas (*Piper nigrum* Linn), é um componente presente em diferentes especiarias e confere sabor aos produtos em que é utilizada. A piperina apresenta características bioativas, com propriedades biológicas, além de propriedades inseticidas (FRIEDMAN et al., 2008).

Considerando a atividade biológica da pimenta-do-reino, estudos científicos realizados nos últimos anos têm evidenciado que a piperina apresenta um amplo espectro de propriedades farmacológicas. Dentre essas atividades, destacam-

se as atividades antioxidantes, hepatoprotetora, efeito anti-inflamatório e analgésico (ZARAI, et al., 2013) e efeito quimiopreventivo (AHMAD, et al., 2012).

A piperina desperta crescente interesse entre os pesquisadores devido ao seu excelente efeito potenciador e baixa toxicidade, demonstrando ser um potenciador eficaz na biodisponibilidade de vários fármacos e outras substâncias farmacológicas ativas, como curcumina, resveratrol, epigallocatequina-3-galato e teofilina, em animais e em voluntários humanos (BANO et al., 1991; SHOBA et al., 1997, DI et al., 2015).

Figura 3 - Estrutura da Piperina



Fonte: FRIEDMAN et al., 2008

Alguns estudos verificaram que a combinação de curcumina e piperina superaram as limitações da biodisponibilidade da curcumina de forma retardar o seu metabolismo hepático e intestinal (SHOBA, et al., 1997; SURESH, SRINIVASAN, 2010; MOORTHI; KATHIRESAN, 2013).

Shoba et al. (1997) avaliaram a biodisponibilidade da cúrcuma quando ministrada com piperina extraída da pimenta preta ou da pimenta longa em estudos *in vivo*. Nos estudos em humanos, os autores observaram que após a ingestão de 2 g de curcumina, os níveis séricos foram muito baixos ($1,35 \pm 0,23 \mu\text{g}$ curcumina. mL^{-1} sangue). A administração concomitante de 20 mg de piperina provocou grande aumento da concentração sérica da curcumina, sendo observado um aumento de 2000% na biodisponibilidade celular da curcumina e não foram observados efeitos colaterais. O estudo concluiu que a piperina na dose empregada em voluntários normais inibiu a glucoronidação hepática e intestinal provocando o aumento da biodisponibilidade da curcumina nas células do organismo.

3. HIDRÓLISE ENZIMÁTICA

O amido é amplamente utilizado em alimentos e aplicações industriais. Para cumprir a função pretendida, modificações físicas, químicas ou

enzimáticas são aplicadas para alcançar as propriedades funcionais (DURA; BŁASZCZAK; ROSELL, 2014). Uma de suas aplicações na indústria alimentar é como fonte de açúcares para produção de adoçantes e hidrolisados, com aplicação em processos fermentativos. Como o amido não é diretamente fermentável há a necessidade de uma hidrólise.

A hidrólise dos biopolímeros de amido cliva as ligações glicosídicas progressivamente, com a necessidade de catalisadores químicos ou enzimáticos capazes de catalisar a romper as ligações glicosídicas, além de água e aumento da temperatura (SUMAN, 2012). As modificações enzimáticas são as mais valorizadas. As vantagens da hidrólise enzimática à hidrólise ácida são relacionadas a facilidade na purificação do hidrolisado (remoção de minerais, odores e sabores indesejáveis), simplificação da linha de produção (reatores unitários de liquefação e sacarificação), gasto energético de produção (na etapa de liquefação) e por não gerar substâncias não indicadas para fins alimentícios como o ácido; no entanto, seu custo de linha de processamento total e mão de obra qualificada são maiores e mais exigentes (SURMELY et al., 2003).

Inicialmente, os grânulos de amido são dispersos em água e aquecidos, causando a gelatinização, que visa favorecer a ação enzimática, reduzindo o tempo de processamento e melhora na qualidade final dos produtos (COPELAND, et al., 2009). Este aumento da temperatura resulta no inchaço da região amorfa do grânulo de amido, causando a ruptura das ligações químicas que mantem a estrutura ordenada, tornando o amido hidratado e suscetível às reações químicas, como a ação das enzimas amilolíticas (SUMAN, 2012).

O processo de hidrólise enzimática do amido é realizado em duas etapas: a liquefação e a sacarificação. Existem muitas enzimas usadas para alterar a estrutura do amido e para alcançar a funcionalidade desejada. As enzimas hidrolisam ligações (α -1 \rightarrow 4) ou (α -1 \rightarrow 6) entre resíduos de α -D-glicose do amido. Na hidrólise enzimática do amido é geralmente utilizado as enzimas α -amilase e amiloglicosidase (DURA; BŁASZCZAK; ROSELL, 2014; LIN et al., 2016).

As enzimas amilolíticas representam o grupo enzimático de grande aplicação industrial. No processo de liquefação há ação da enzima α -amilase, endoenzima que apresenta atividade hidrolítica atuando na clivagem das ligações glicosídicas α -1,4 de forma aleatória (LÉVÊQUE et al., 2000). A ação desta enzima

reduz o tamanho molecular do amido e diminui a viscosidade da solução, liquefazendo o meio (LIN et al., 2016).

Após a liquefação, a solução é hidrolisada a glicose por uma enzima sacarificante, a amiloglucosidase. Esta é uma exoenzima que produz D-glicose a partir da extremidade não redutora da cadeia de amido e atua sobre as ligações glicosídicas α -1,4 e α -1,6. O resultado dessa segunda etapa é uma solução de sacarídeos de baixa massa molecular, predominantemente glicose e maltose (ROCHA, 2007; DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2008).

4. ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Fonte de nutrientes essenciais para a manutenção do metabolismo humano, os alimentos nos fornecem também compostos que promovem benefícios à saúde e reduzem o risco de desenvolvimento de doenças crônicas não transmissíveis. Esses compostos são designados de compostos bioativos e seu efeito protetor tem sido atribuído, em grande parte, a propriedades biológicas ditas promotoras da saúde, tais como a atividade antioxidante (KASOTE, et al., 2015).

Espécies reativas de oxigênio, tais como radical hidroxila ($\cdot\text{OH}$), ânion radical superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) e hidroperoxila ($\text{ROO}\cdot$), causam danos ao DNA ou podem oxidar lipídios e proteínas em nível celular. O ataque das espécies reativas de oxigênio às cadeias de ácidos graxos poliinsaturados dos fosfolipídios e do colesterol, constituinte das membranas celulares, produzem radicais que podem reagir com o oxigênio e originar radicais peroxilas que por sua vez, propagam a reação resultando na oxidação de diversas moléculas de ácidos graxos (VOLP; RENHE; STRINGUETA, 2009).

O estresse oxidativo é definido como o desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio e o mecanismo de defesa antioxidante, que é caracterizado pela incapacidade de antioxidantes endógenos de neutralizar os danos oxidativos em alvos biológicos. Esta relação a muito tem sido associada à diferentes condições fisiopatológicas. Os antioxidantes podem ser sintetizados *in vivo* (antioxidantes endógenos) ou consumidos (antioxidantes exógenos), nesse contexto, presume-se que uma dieta rica em antioxidantes é inversamente proporcional ao risco de desenvolvimento de algumas patologias, como câncer e doenças cardiovasculares (LÓPEZ-ALARCÓN; DENICOLA, 2013).

De forma geral, denominam-se antioxidantes as substâncias que, presentes em concentrações baixas comparadas ao substrato oxidável, retardam significativamente ou inibem a oxidação do substrato. Uma das principais reações relacionadas à função dos antioxidantes é a abstração do hidrogênio. Nesta reação, o antioxidante é a fonte do hidrogênio que será abstraído, ou seja, ele doa o átomo de hidrogênio ao radical livre, removendo a região reativa da molécula, assim, a molécula não apresenta mais um elétron desapareado e torna-se estável. Mesmo sofrendo oxidação e se transformando em um radical, os radicais formados a partir de antioxidantes não são reativos para propagar a reação em cadeia, sendo neutralizados por reação com outro radical formando produtos estáveis ou podem ser reciclados por outro antioxidante (ZILIOLI, 2011; KASOTE, et al., 2015).

Os principais compostos antioxidantes em alimentos capazes de doar hidrogênio aos radicais livres são os fenóis e polifenóis, tióis, ácido úrico, ácido ascórbico e carotenóides, entre outros. Esses compostos estão presentes em matérias-primas de origem vegetal e têm apresentado relevante ação contra o estresse oxidativo e conseqüentemente interesse no combate a doenças degenerativas, merecendo crescente interesse de pesquisas científicas (ZILIOLI, 2011).

Diferentes técnicas têm sido utilizadas para a determinação da atividade antioxidante de substâncias biologicamente ativas com fundamentos, mecanismos de ação, maneiras de expressar resultado e aplicações diferentes. Esses métodos concendem diferentes informações sobre a interação entre as espécies reativas de oxigênio e a amostra em estudo. A validação de metodologias para a avaliação antioxidante, em especial para matrizes complexas como a observada em alimentos, tem se baseado em estimativas da capacidade do produto em interesse em sequestrar ou causar redução de radicais, capacidade de o antioxidante proteger a molécula alvo exposta a radicais livres e a capacidade de antioxidantes inibir a oxidação de lipoproteína de baixa densidade (LÓPEZ-ALARCÓN; DENICOLA, 2013; BARANKEVICZ, 2015).

Outro fator que influencia os resultados de análises antioxidantes são os sistemas de solventes utilizados na extração dos compostos polifenólicos de matérias vegetais. O tipo de solvente e a polaridade podem afetar a forma de atuar da molécula quanto a transferência de elétrons e de átomos de hidrogênio. Além do

rendimento da extração, há grande variação na composição do extrato em função do sistema solvente utilizado (ROCKENBACH, et al., 2008).

5. ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

A deterioração tem sido uma das grandes preocupações e uma das maiores causas de perdas de alimentos e de prejuízos à saúde. O uso de aditivos tem sido efetivo na prevenção da deterioração dos alimentos, entretanto, a demanda por produtos naturais tem aumentado devido à conscientização sobre os efeitos tóxicos de alguns aditivos e à tendência atual de se voltar ao natural. Desta forma, pesquisas são necessárias para identificar substâncias naturais capazes de substituir os aditivos na inibição de bactérias e de fungos. Algumas plantas podem ser utilizadas como alternativa para o controle de agentes deteriorantes de alimentos por conterem substâncias com atividade antimicrobiana e por terem sido consumidas por várias décadas sem causar efeitos adversos ao homem (GUPTA et al., 2015).

A atividade antimicrobiana é a capacidade de um determinado composto em causar algum dano a um microrganismo, eliminando-o ou impedindo sua multiplicação. Pesquisas para avaliar a atividade antimicrobiana podem ser realizadas por meio de estudos com microrganismos de interesse na área alimentícia. As culturas bacterianas mais frequentemente estudadas são relacionadas a surtos de toxiinfecção e são as bactérias Gram positivas, como o *Staphylococcus aureus*, que são responsáveis por infecções pós-operatórias e alimentares e o *Bacillus cereus*, cujos esporos apresentam resistência térmica e tem habilidade de sobreviver por longos períodos em alimentos desidratados; e bactérias Gram negativas, da família *Enterobacteriaceae* como *Salmonella* spp., *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*, presentes no intestino humano e de animais e causadoras de infecções urinárias e septicemia (COWAN, 1999; REZENDE, JÚNIOR ; AMARAL, 2000).

Atualmente, existem vários métodos para avaliar a atividade antimicrobiana, como método de difusão em ágar e método de macrodiluição e microdiluição. No método de difusão de ágar, a capacidade antimicrobiana de um agente pode ser determinada pelo tamanho do halo de inibição formado ao redor de discos de papel com extratos fenólicos depositados sobre o meio ágar (PINTO et al., 2003). No método por macrodiluição ou microdiluição é determinado a concentração mínima que impede o crescimento visível do microrganismo (Concentração Mínima Inibitória – CMI) e a Concentração Mínima Bactericida (CMB). O método de

macrodiluição em caldo considera a relação entre o crescimento do microrganismo no meio líquido e a concentração de um composto de interesse. Onde não houver crescimento não haverá turbidez e conseqüentemente teremos a concentração que causa a inibição do crescimento do microrganismo em teste (ROZZATO, 2008).

6. REFERÊNCIAS

AHMAD, Nisar et al. Biological role of Piper nigrum L.(Black pepper): A review. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 2, n. 3, p. S1945-S1953, 2012.

BALASUBRAMANYAM, Karanam et al. Curcumin, a novel p300/CREB-binding protein-specific inhibitor of acetyltransferase, represses the acetylation of histone/nonhistone proteins and histone acetyltransferase-dependent chromatin transcription. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 49, p. 51163-51171, 2004.

BANO, G. et al. Effect of piperine on bioavailability and pharmacokinetics of propranolol and theophylline in healthy volunteers. **European journal of clinical pharmacology**, v. 41, n. 6, p. 615-617, 1991.

BARANKEVICZ, Gizele Bruna. **Poder antioxidante da cúrcuma (Curcuma longa L.) nos parâmetros neuroquímicos em ratos induzidos a depressão**. 2015. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2015.

BERNI, R.F.; CHAVES, F.C.M.; PINHEIRO, J.B.; VAZ, A.P.A.. Produção de açafão em função de acessos e do peso de rizomas-semente. **Rev. bras. plantas med.**, Botucatu , v. 16, n. 3, supl. 1, p. 765-770, 2014 .

BRAGA, M. E. M.; MORESCHI, S. R. M; MEIRELES, M. A. A. Effects of supercritical fluid extraction on *Curcuma longa* L. and *Zingiber officinale* R. starches. **Carbohydrate Polymers**, v. 63, n. 3, p. 340-346, 2006.

BRASIL. ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Farmacopéia Brasileira, volume 2 / 5ª Edição. Brasília, 2010. 2v/il. Pg. 893. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/hotsite/cd_farmacopeia/pdf/volume2.pdf Acesso em 19 de março de 2017.

BRASIL. ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Organizada por aditivo alimentar. Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/documents/33916/388779/Comp%25C3%25AAndio%2B-%2BJUNHO%2B2015_em%2Batualiza%25C3%25A7%25C3%25A3o2.pdf/a87d0498-d814-4378-81e3-9293f79eb4a9 Acesso em 19 de março de 2017.

CHENG, Ann-Lii et al. Phase I clinical trial of curcumin, a chemopreventive agent, in patients with high-risk or pre-malignant lesions. **Anticancer Res**, v. 21, n. 4B, p. 2895-2900, 2001.

CHONPATHOMPIKUNLERT, Pennapa; WATTANATHORN, Jintanaporn; MUCHIMAPURA, Supaporn. Piperine, the main alkaloid of Thai black pepper, protects against neurodegeneration and cognitive impairment in animal model of cognitive deficit like condition of Alzheimer's disease. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, n. 3, p. 798-802, 2010.

CHUANG, S. E., CHENG, A. L., LIN, J. K., ; KUO, M. L. Inhibition by curcumin of diethylnitrosamine-induced hepatic hyperplasia, inflammation, cellular gene products and cell-cycle-related proteins in rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 38, n. 11, p. 991-995, 2000.

COPELAND, Les et al. Form and functionality of starch. **Food hydrocolloids**, v. 23, n. 6, p. 1527-1534, 2009.

COWAN, M.M. Plant products as antimicrobial agents. **Clinical Microbiology Reviews**, v.12, n. 4, p. 564-582, 1999.

DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L.; FENNEMA, O. R. **Química de Alimentos de Fennema**. 4 ed. Porto Alegre: Artmed, 2008.

DI, X., WANG, X., & LIU, Y. (2015). Effect of piperine on the bioavailability and pharmacokinetics of emodin in rats. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, 115, 144-149.

DURA, A.; BŁASZCZAK, W.; ROSELL, Cristina M. Functionality of porous starch obtained by amylase or amyloglucosidase treatments. **Carbohydrate polymers**, v. 101, p. 837-845, 2014.

ESATBEYOGLU, Tuba et al. Curcumin—from molecule to biological function. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 51, n. 22, p. 5308-5332, 2012.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO). FAOESTAT 2017. Disponível em: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC/visualize> Acesso em 19 de março de 2017.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO). Online Edition: "Combined Compendium of Food Additive Specifications". Prepared at the 61st JECFA (2003) and published in FNP 52 Add 11 (2003). Disponível em: <http://www.fao.org/ag/agn/jecfa-additives/specs/Monograph1/Additive-140.pdf> Acesso em 19 de março de 2017.

FRIEDMAN, M., LEVIN, C. E., LEE, S. U., LEE, J. S., OHNISI-KAMEYAMA, M., ; KOZUKUE, N. Analysis by HPLC and LC/MS of pungent piperamides in commercial black, white, green, and red whole and ground peppercorns. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 56, n. 9, p. 3028-3036, 2008.

GANGWAR, Rajesh K. et al. Curcumin conjugated silica nanoparticles for improving bioavailability and its anticancer applications. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 61, n. 40, p. 9632-9637, 2013.

GÖREN, Ahmet C. et al. Rapid quantitation of curcumin in turmeric via NMR and LC–tandem mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 113, n. 4, p. 1239-1242, 2009.

GUPTA, Ankur; MAHAJAN, Surabhi; SHARMA, Rajendra. Evaluation of antimicrobial activity of *Curcuma longa* rhizome extract against *Staphylococcus aureus*. **Biotechnology reports**, v. 6, p. 51-55, 2015.

HUANG, Dejian; OU, Boxin; PRIOR, Ronald L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 53, n. 6, p. 1841-1856, 2005.

ISI – International Starch Institute. Disponível em: <http://www.starch.dk/isi/stat/rawmaterial.asp> Acesso em 19 de março de 2017.

JHA, Niki S. et al. Antioxidant activity and electrochemical elucidation of the enigmatic redox behavior of curcumin and its structurally modified analogues. **Electrochimica Acta**, v. 151, p. 574-583, 2015.

JYOTHI, A. N.; MOORTHY, S. N.; VIMALA, B. Physicochemical and functional properties of starch from two species of *Curcuma*. **International Journal of Food Properties**, v. 6, n. 1, p. 135-145, 2003.

KASOTE, Deepak M. et al. Significance of antioxidant potential of plants and its relevance to therapeutic applications. **International journal of biological sciences**, v. 11, n. 8, p. 982, 2015.

KIAMAHALLEH, Mohammad Valizadeh et al. High performance curcumin subcritical water extraction from turmeric (*Curcuma longa* L.). **Journal of Chromatography B**, v. 1022, p. 191-198, 2016.

LEAL, Régis Casimiro; NETO, José Machado Moita. Amido: Entre a Ciência e a Cultura. **Química Nova na escola**. v. 35, n 2, p. 75-78, maio 2013.

LEONEL, M.. Análise da forma e tamanho de grânulos de amidos de diferentes fontes botânicas. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, v. 27, n. 3, p. 579-588, Setembro de 2007.

LEONEL, M.; CEREDA, M. P.. Caracterização físico-química de algumas tuberosas amiláceas. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, v. 22, n. 1, p. 65-69, Jan. 2002

LEV-ARI, Shahar et al. Inhibition of pancreatic and lung adenocarcinoma cell survival by curcumin is associated with increased apoptosis, down-regulation of COX-2 and EGFR and inhibition of Erk1/2 activity. **Anticancer research**, v. 26, n. 6B, p. 4423-4430, 2006.

LÉVÊQUE, Emmanuel et al. Thermophilic archaeal amylolytic enzymes. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 26, n. 1, p. 3-14, 2000.

LIN, Lingshang et al. Molecular structure and enzymatic hydrolysis properties of starches from high-amylose maize inbred lines and their hybrids. **Food Hydrocolloids**, v. 58, p. 246-254, 2016.

LÓPEZ-ALARCÓN, Camilo; DENICOLA, Ana. Evaluating the antioxidant capacity of natural products: A review on chemical and cellular-based assays. **Analytica chimica acta**, v. 763, p. 1-10, 2013.

MANIGLIA, B. C. et al. Turmeric dye extraction residue for use in bioactive film production: Optimization of turmeric film plasticized with glycerol. **LWT-Food Science and Technology**, v. 64, n. 2, p. 1187-1195, 2015.

MANIGLIA, Bianca Chierigato. **Elaboração de filmes biodegradáveis a partir do resíduo da extração do pigmento de Cúrcuma**. 2012. Dissertação (Mestrado em Química) - Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

MOORTHI, C.; KATHIRESAN, K. Curcumin–Piperine/Curcumin–Quercetin/Curcumin–Silibinin dual drug-loaded nanoparticulate combination therapy: A novel approach to target and treat multidrug-resistant cancers. **Journal of Medical Hypotheses and Ideas**, v. 7, n. 1, p. 15-20, 2013.

MORAES, J.O. **Propriedades de filmes de amido incorporados de nanoargilas e fibras de celulose**. 2009.75f. Dissertação (Mestrado) -Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2009

NATARAJAN, Chandramohan; BRIGHT, John J. Curcumin inhibits experimental allergic encephalomyelitis by blocking IL-12 signaling through Janus kinase-STAT pathway in T lymphocytes. **The Journal of Immunology**, v. 168, n. 12, p. 6506-6513, 2002.

NISHIYAMA, T., MAE, T., KISHIDA, H., TSUKAGAWA, M., MIMAKI, Y., KURODA, M., ... ; KITAHARA, M. Curcuminoids and sesquiterpenoids in turmeric (*Curcuma longa L.*) suppress an increase in blood glucose level in type 2 diabetic KK-Ay mice. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 53, n. 4, p. 959-963, 2005.

PEREIRA, A. S.; STRINGHETA, P. C. Considerações sobre a cultura e processamento do açafrão. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 16, n. 2, p. 102-105, 1998.

PINTO, Terezinha de Jesus Andreoli; KANEKO, Telma Mary; OHARA, Mitsuko Taba. **Controle biológico de qualidade de produtos farmacêuticos correlatos e cosméticos**. Atheneu, 2003.

PRASAD, Sahdeo et al. Curcumin, a component of golden spice: from bedside to bench and back. **Biotechnology advances**, v. 32, n. 6, p. 1053-1064, 2014.

PRIYADARSINI, K. Indira. Photophysics, photochemistry and photobiology of curcumin: Studies from organic solutions, bio-mimetics and living cells. **Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews**, v. 10, n. 2, p. 81-95, 2009.

RAM, Arjun; DAS, Moumita; GHOSH, Balaram. Curcumin attenuates allergen-induced airway hyperresponsiveness in sensitized guinea pigs. **Biological ; pharmaceutical bulletin**, v. 26, n. 7, p. 1021-1024, 2003.

REZENDE, Naiá Carla Marchi; JÚNIOR, Oswaldo Durival Rossi; AMARAL, Luiz Augusto. Ocorrência de bactérias do grupo do *Bacillus cereus* em leite UHT integral (ultra-high-temperature). **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 7, n. 3, 2000.

ROCHA, Thaís de Souza. Estudo da hidrólise enzimática do amido de mandioca-salsa (*Arracacia xanthorrhiza*): efeito do tamanho dos grânulos. 2007.

ROCKENBACH, Ismael Ivan et al. Influência do solvente no conteúdo total de polifenóis, antocianinas e atividade antioxidante de extratos de bagaço de uva (*Vitis vinifera*) variedades Tannat e Ancelota. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, n. 1, p. 238-244, 2008.

ROZATTO, Mariana Rodrigues. **Determinação da atividade antimicrobiana in vitro de extratos, frações e compostos isolados de Arrabidaea brachypoda**. 2012. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Araraquara, 2012.

SAHNE, Foozie et al. Enzyme-assisted ionic liquid extraction of bioactive compound from turmeric (*Curcuma longa* L.): Isolation, purification and analysis of curcumin. **Industrial Crops and Products**, v. 95, p. 686-694, 2017.

SCARTEZZINI, Paolo; SPERONI, Ester. Review on some plants of Indian traditional medicine with antioxidant activity. **Journal of ethnopharmacology**, v. 71, n. 1, p. 23-43, 2000.

SHARMA, Ricky A. et al. Pharmacodynamic and pharmacokinetic study of oral *Curcuma* extract in patients with colorectal cancer. **Clinical Cancer Research**, v. 7, n. 7, p. 1894-1900, 2001.

SHOBA, Guido et al. Influence of piperine on the pharmacokinetics of curcumin in animals and human volunteers. **Planta medica**, v. 64, n. 04, p. 353-356, 1998.

SUETH-SANTIAGO, V. et al. Curcumina, o pó dourado do açafrão-da-terra: introspecções sobre química e atividades biológicas. **Química Nova**, v. 38, n. 4, p. 538-552, 2015.

SUMAN, Priscila Aparecida; LEONEL, Magali. Obtenção de vinagre a partir de mandioca e gengibre. **Energia na Agricultura**, v. 28, n. 1, p. 52-56, 2013.

SUMANONT, Y., MURAKAMI, Y., TOHDA, M., VAJRAGUPTA, O., WATANABE, H., ; MATSUMOTO, K. Prevention of kainic acid-induced changes in nitric oxide level and neuronal cell damage in the rat hippocampus by manganese complexes of curcumin and diacetylcurcumin. **Life sciences**, v. 78, n. 16, p. 1884-1891, 2006.

SURESH, D.; SRINIVASAN, K. Tissue distribution ; elimination of capsaicin, piperine ; curcumin following oral intake in rats. **Indian J. Med. Res.** 131, 682– 691. 2010.

SURMERLY, R., ALVAREZ, H., CEREDA, M. P., ; VILPOUX, O. Hidrólise do amido. In: VILPOUX, Olivier; AVEROUS, Luc. **Culturas de tuberosas amiláceas latino americanas**. São Paulo: Cargill, v. 3, p. 377-488, 2003.

VOLP, A.C.P; RENHE, I.R.T.; STRINGUETA, P.C.. Pigmentos naturais bioativos. **Alimentos e Nutrição** Araraquara, v. 20, n. 1, p. 157-166, 2009.

WANG, Jiao et al. Anti-inflammatory activity of curcumin-loaded solid lipid nanoparticles in IL-1 β transgenic mice subjected to the lipopolysaccharide-induced sepsis. **Biomaterials**, v. 53, p. 475-483, 2015.

ZARAI, Zied et al. Antioxidant and antimicrobial activities of various solvent extracts, piperine and piperic acid from *Piper nigrum*. **LWT-Food Science and Technology**, v. 50, n. 2, p. 634-641, 2013.

ZILIOLI, Estevão. **COMPOSIÇÃO QUÍMICA E PROPRIEDADES FUNCIONAIS NO PROCESSAMENTO DE VINAGRES**. 2011. Tese de Doutorado. Universidade Estadual de Campinas - Faculdade de Engenharia De Alimentos.

CAPÍTULO 2 – HIDROLISADO ENZIMÁTICO COM ALTO TEOR DE GLICOSE, A BASE DE *CURCUMA LONGA* E *PIPER NIGRUM*, APRESENTA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E ANTIMICROBIANA

Mariana Assis de Queiroz Cancian ^a, Thais de Souza Rocha ^a, Wilma Aparecida Spinosa ^a

^a Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Estadual de Londrina

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi desenvolver um hidrolisado enzimático a base de *Curcuma longa* associado a *Piper nigrum* e determinar sua atividade antioxidante, pelos métodos DPPH, ABTS e FRAP, determinação de compostos polifenólicos e atividade antimicrobiana, por macrodiluição. O melhor solvente para extração de compostos polifenólicos e curcumina foi determinado. O hidrolisado enzimático de cúrcuma e pimenta-do-reino foi obtido com valores próximos a 100% de teor de DE e apresentou o mesmo teor de curcumina presente na cúrcuma *in natura*, sugerindo que a hidrólise do amido permitiu a liberação deste composto de sua matriz. Extratos obtidos a partir de etanol 80% foram selecionados para as análises. A curcumina pode ser o composto responsável pela redução do íon férrico na metodologia FRAP, pois o mesmo teor de curcumina foi encontrado para cúrcuma *in natura* e hidrolisado enzimático e não houve alteração da capacidade antioxidante por este método. Outros compostos polifenólicos presentes na cúrcuma também são responsáveis pela capacidade antioxidante por transferência de elétrons e não foram recuperados no hidrolisado. A presença de piperina da pimenta-do-reino no hidrolisado foi comprovada por FTIR, e pode aumentar a biodisponibilidade da curcumina. As linhagens bacterianas estudadas, *S. aureus*, *B. cereus*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *Salmonella Enteritidis*, *Salmonella Typhi* e *P. aeruginosa*, foram sensíveis ao extrato etanólico do rizoma de cúrcuma e do hidrolisado. Os resultados comprovaram a ação antioxidante e antimicrobiana hidrolisado enzimático obtido.

1. INTRODUÇÃO

A cúrcuma é uma especiaria indiana derivada dos rizomas da planta *Curcuma longa* L., sua coloração amarelada é devido a presença de compostos polifenólicos denominados curcuminoides. Devido a grande quantidade de amido presente no rizoma (MANIGLIA, et al., 2015), a cúrcuma se torna uma matéria-prima

com potencial para a produção de hidrolisado rico em açúcares e de produtos fermentados.

Os curcuminoides presentes na cúrcuma são três: a curcumina, a demetoxicurcumina e a bisdemetoxicurcumina (HMAR; KALITA; SRIVASTAVA, 2017) e sua aplicação na indústria alimentar é principalmente como corante natural (MANGOLIM et al., 2014). Diversas pesquisas, no último meio século, provaram que a especiaria tem diferentes propriedades biológicas e estas estão associadas e atribuídas, principalmente, à curcumina (MANOLOVA, et al., 2014). A curcumina apresenta atividades antioxidante, anti-inflamatória, anticancerígena e antimicrobiana (PRASAD, et al., 2014; WANG et al., 2015; GANGWAR, et al., 2013; GUPTA, et al., 2015).

A farinha de rizoma de cúrcuma pode conter de 0,02 a 10,9% do seu peso seco em curcumina (ESATBEYOGLU et al., 2012). A curcumina apresenta estrutura polifenólica, contém um radical metoxi e um grupamento hidroxila, interconectados simetricamente em conjugação por uma fração β -dicetona (SAHNE, et al., 2017). A fração β -dicetona é responsável pela transferência de um átomo de hidrogênio intramolecular, o que permite à curcumina exibir um tautomerismo ceto-enólico. O equilíbrio ceto-enólico é parcialmente dependente da polaridade e do pH do solvente (PRIYADARSINI, 2009; ESATBEYOGLU, et al., 2012).

Os diferentes grupos funcionais da curcumina podem contribuir para atividades biológicas, como a atividade antioxidante e antimicrobiana. O comportamento redox da curcumina pode ser atribuído a diferentes mecanismos de doação de um átomo de hidrogênio quer seja do grupamento fenólico, ou metoxifenólico ou do enólico, no entanto ainda não há um consenso (JOVANOVIC, et al., 1999; PRIYADARSINI, et al., 2003; JHA, et al., 2015).

Apesar de apresentar perfil de segurança e benefícios para a saúde, a curcumina apresenta baixa solubilidade aquosa e rápida eliminação sistêmica, o que resulta em baixa biodisponibilidade (KUMAR, et al. 2016). Sabe-se que a piperina, metabólito secundário presente na pimenta-do-reino, aumenta a biodisponibilidade de algumas substâncias, entre elas a curcumina (MOORTHI; KATHIRESAN, 2013). Alguns estudos verificaram que a combinação de curcumina e piperina superaram as limitações da biodisponibilidade da curcumina de forma a retardar o seu metabolismo hepático e intestinal (SHOBA, et al., 1997; SURESH; SRINIVASAN, 2010; MOORTHI; KATHIRESAN, 2013).

De forma a buscar uma maior diversidade de produtos à base de cúrcuma com aumento da biodisponibilidade de curcumina, este estudo teve como objetivo desenvolver um hidrolisado a base cúrcuma e pimenta-do-reino, com alto teor de dextrose equivalente e capacidade antioxidante e antimicrobiana, para aplicação em produtos alimentícios.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. MATERIAL

Farinha de rizoma de cúrcuma e pimenta-do-reino em pó, foram obtidas no comércio de São Paulo – SP. Utilizou-se a enzima Termamyl 120L (Novozymes®, Dinamarca), que é um preparado enzimático líquido e concentrado a base de α -amilase termoestável, de grau alimentício (GRAS) produzido a partir de cepas selecionadas de *Bacillus licheniformes*, com pH ótimo de 6 a 8, temperatura ótima entre 90 e 105 ° C e atividade enzimática de 120 KNU-T/g. A enzima AMG 300L (Novozymes®, Dinamarca), que é uma amiloglicosidase GRAS, produzida a partir de uma cepa selecionada de *Aspergillus niger*, com pH ótimo entre 4 e 4,5, temperatura ótima de 58 a 60 ° C e atividade enzimática de 300 AGU/ml (NOVOZYMES, 2015) também foi utilizada. O reagente padrão usado na CLAE foi a curcumina, com grau de pureza superior a 98%, da marca Sigma-Aldrich (Estados Unidos). Outros reagentes utilizados foram de grau analítico (P.A.).

2.2. COMPOSIÇÃO FÍSICO QUÍMICA

As análises físico-químicas da farinha de rizoma de cúrcuma e da pimenta-do-reino em pó foram realizadas, separadamente, em triplicata pelas técnicas preconizadas de acordo com as normas da AACCC (2000): umidade (44-15A), lipídeos (30-10), proteína (46-13), cinzas (08-10). Já o teor de carboidratos foi estimado por diferença. Para a farinha de rizoma de cúrcuma foram realizadas também as análises de fibra bruta total, pelo método 962.09 (AOAC, 2012), amido total por método enzimático com o kit K-TSTA 09/14, Megazyme (Irlanda), recomendado pela AOAC (2012) técnica 996.11. O pH foi determinado de acordo com metodologia 981.12 (AOAC, 2012). O teor de açúcares solúveis totais foi determinado pelo método de fenol-sulfúrico (Dubois et al., 1956) e o teor de açúcares redutores através do método de Somogy e Nelson (1945).

2.3. PROPRIEDADE DA PASTA DO AMIDO DA FARINHA DE RIZOMA DE CÚRCUMA COM PIMENTA-DO-REINO

As propriedades de pasta da farinha de rizoma de cúrcuma com pimenta-do-reino foram determinadas utilizando um Viscoamilógrafo Brabender (Pt 100, Alemanha).

A razão das matérias-primas foi baseada na relação entre os princípios ativos responsáveis pelas características bioativas da cúrcuma (curcumina) e da pimenta-do-reino (piperina), assim a proporção considerada foi de 1:100 de piperina:curcumina, estabelecida conforme Shoba et al. 1997. De acordo com Li et al. (2015) a piperina está presente na pimenta na concentração de 3 a 7%.

A suspensão da farinha de rizoma de cúrcuma com pimenta-do-reino na proporção de 150 g.L⁻¹, no total de 300 mL de água, foi transferida para o recipiente de alumínio. A suspensão foi aquecida de 30 °C a 95 °C à razão de 1,5 °C . minuto⁻¹, mantendo-se em 95 °C por 10 minutos, e resfriada até 50 °C, na mesma razão, mantendo-se por mais 10 minutos a 50 °C. Durante todo o experimento, a suspensão foi mantida sob agitação constante de 70 rpm.

2.4. HIDRÓLISE ENZIMÁTICA

2.4.1. Determinação do Tempo de Liquefação e Sacarificação

No estudo da hidrólise enzimática da farinha de rizoma de cúrcuma e pimenta-do-reino a variável tempo foi considerada independente de demais fatores, e para sua determinação foram feitos estudos individuais.

A extensão da liquefação e sacarificação foi avaliada pela quantidade de açúcares redutores gerados pela ação das enzimas, expressa em teor de dextrose equivalente (DE), o que representa uma medida de açúcares redutores presentes no produto como porcentagem do total de amido (SPINOSA et al., 2016).

Para etapa de liquefação, o valor do pH do sistema foi de 6,03±0,15, valor obtido na suspensão e encontra-se na faixa ótima de atuação da enzima. O valor da temperatura foi fixado em grandeza superior à temperatura da viscosidade de pico, obtida experimentalmente, de modo a garantir a total gelatinização dos grânulos de amido. A concentração de enzima foi de 0,17 kg.100 g⁻¹ de amido da farinha de rizoma de cúrcuma (NOVOZYME, 2015). O tempo de reação foi determinado através de um

estudo experimental onde foi simulada a liquefação utilizando Viscoamilógrafo para acompanhar a queda de viscosidade após aplicação da enzima α -amilase. O tempo foi definido de acordo com a menor viscosidade e o maior valor de DE.

A etapa de sacarificação foi realizada pelo uso da enzima amiloglicosidase. Os fatores pH, temperatura e concentração de enzima em relação ao substrato foram fixados em 4,50, 60 ° C e 0,3 mL.100 g⁻¹, respectivamente (NOVOZYME, 2015). O pH foi ajustado com ácido fosfórico 6 M, de grau alimentício. Para a determinação do tempo necessário para sacarificação, foi conduzido um estudo cinético com uma concentração enzimática fixa conforme metodologia descrita por Spinosa et al., 2016. A agitação foi constante, a 150 rpm, durante todo processo.

2.4.2. Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR)

Para otimizar a máxima obtenção de teor DE (Y) do hidrolisado de cúrcuma e pimenta-do-reino foi avaliado a influência da concentração das enzimas α -amilase (X₁) e amiloglicosidase (X₂) através de um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) 2², incluindo 4 pontos axiais ($\pm\alpha$) e 5 repetições no ponto central, totalizando 13 ensaios. A distância do ponto axial foi de $\pm 1,41$, calculado conforme a Equação 1.

$$\alpha = (2^n)^{1/4} \quad \text{Equação 1}$$

Onde α é a distância do ponto axial e n o número de variável independente. Os ensaios foram realizados de forma a obter um modelo matemático de segunda ordem, com o objetivo de prever o valor de DE (Y) obtido no hidrolisado de cúrcuma e pimenta-do-reino.

O modelo obtido neste estudo foi validado através da execução de determinação em triplicata nas condições ideais previstas. Os resultados, obtidos a partir do modelo empírico, foram comparados aos teores de DE mensurados nos experimentos de validação por meio do teste *t*, para $p < 0,05$.

2.4.3. Perfil dos açúcares obtidos na hidrólise por Cromatografia de troca aniônica de alta eficiência

O perfil de açúcares obtidos no hidrolisado de cúrcuma com pimenta-do-reino foi analisado usando o HPAEC-PAD (ICS 3000, Dionex Corporation, EUA) equipado com amostrador automático AS40, conforme metodologia descrita por

Moraes, Branzani e Franco (2014) com adaptações. Alíquotas de 20 µL das amostras filtradas foram automaticamente injetadas no equipamento constituído por uma coluna de troca aniônica CarboPac PA-200 (250 x 3 mm) em combinação com uma guarda-coluna CarboPac PA-200. A forma de onda empregada foi a *standard quadruple* com os seguintes potenciais de pulso e durações: E1 = 0,10 V (t1 = 0,40 s); E2 = -2,00 V (t2 = 0,02 s); E3 = 0,60 V (t3 = 0,01 s); E4 = -0,10 V (t4 = 0,06 s). Os parâmetros da fase móvel utilizados para a separação foram constituídos pelo eluente A (200 mM NaOH) e eluente B (1 M acetato de sódio e 100 mM NaOH), com fluxo de 0,5 mL.min⁻¹ e temperatura de 30 °C. Os eluentes foram preparados com água deionizada ultra-pura (18 MΩ.cm⁻¹) e degaseificados com N₂. O gradiente ótimo foi: 0 - 10 min: gradiente linear de 100 mM de hidróxido de sódio; 10 - 25 min: gradiente linear de 70 a 130 mM de acetato de sódio e constante de 100 mM de hidróxido de sódio; 25-30 min: gradiente linear de 100 mM de hidróxido de sódio. Uma mistura de maltodextrinas (grau de polimerização de 1 a 7) foi usada para identificação da série homóloga de comprimento de cadeias. Os dados foram coletados e analisados utilizando-se o *software* Chromeleon, versão 6.8 (Dionex Corporation, EUA).

2.5. EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE CURCUMINA

A metodologia utilizada para o preparo dos extratos da farinha de rizoma de cúrcuma e do hidrolisado de cúrcuma e pimenta-do-reino para obtenção de curcumina segue a descrição de Chirangini, Sharma e Sinha (2004), com adaptações. Pesou-se 1 g da matéria em estudo e adicionou-se 10 mL de solvente extrator. Os solventes utilizados foram etanol: água (80:20 v/v), metanol: água (80:20 v/v), acetona: água (80:20 v/v), água e ácido acético (AKINOLA, et al., 2014; JHA, et al.; 2015; GUPTA, et al., 2015; HUANG, et al., 2016). Para o hidrolisado foi utilizado apenas o solvente etanol: água (80:20 v/v). A mistura foi homogeneizada em agitador rotatório por 20 horas a 150 rpm. A amostra foi centrifugada a 15.000 rpm por 15 minutos. O sobrenadante foi armazenado em frascos âmbar, protegidos da luz e mantido sob refrigeração até a realização das análises de atividade antioxidante e compostos polifenólicos.

A quantificação de curcumina por CLAE foi realizada em cada extrato com seu respectivo solvente extrator e para a comparação entre o rizoma de cúrcuma e o hidrolisado o solvente foi acetonitrila. Os extratos da farinha de rizoma de cúrcuma e dos hidrolisados de cúrcuma e da pimenta-do-reino foram preparados de acordo

com metodologia descrita por Long, et al. (2014), com adaptações. Partiu-se de 0,1 g da amostra em que se adicionou 5 mL de solvente extrator. Esta solução foi levada ao banho ultrassônico por 30 minutos seguida de centrifugação a 11.000 rpm por 50 minutos. O sobrenadante obtido foi filtrado em membrana de 0,22 µm PTFE e PVDF, de acordo com o solvente. A quantificação de curcumina foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (Shimadzu Corp., Japão), equipado com detector UV-VIS (Wichitnithad, et al., 2009). O volume de injeção foi de 10 µL com fluxo de 2,0 mL.min⁻¹. A coluna utilizada foi C-18 Altech (150 mm, 4,6 mm i.d, 5µm, Shiseido, Japan). A fase móvel era isocrática e composta por uma mistura acetonitrila: ácido acético 2%, na proporção 55:45. Os analitos em cada amostra foram identificados por comparação no tempo de retenção em 13,6 minutos no comprimento de onda 425 nm, com o padrão de curcumina. A integração dos picos cromatográficos foi realizada com o auxílio do *software* LC Solutions (Shimadzu Corp., Japão).

2.6. DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS POLIFENÓLICOS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Os extratos obtidos em diferentes solventes foram caracterizados quanto à espectrometria de absorção UV-Vis (Genesys6 UV-VIS Thermo®, EUA) e pH (981.12 - AOAC, 2012). A determinação de compostos polifenólicos totais e a avaliação da atividade antioxidante, pelos métodos DPPH, ABTS, FRAP foram realizadas para as matérias-primas rizoma de cúrcuma e pimenta-do-reino em pó e no hidrolisado, em extrato etanólico. Para o hidrolisado, os resultados foram expressos em relação a concentração inicial de cúrcuma.

2.6.1. Determinação de compostos polifenólicos totais

O teor de polifenólicos totais nos extratos foi estimado utilizando-se o reagente de Folin-Ciocalteu, de acordo com a metodologia proposta por Singleton; Orthofer e Lamuela-Raventos (1999). Para a reação, foram misturados 0,5 mL de cada extrato, 0,5 mL de reagente Folin-Ciocalteu 0,9 N e 0,5 mL de solução de carbonato de sódio a 10%. Feita a homogeneização, as amostras foram mantidas em temperatura ambiente com proteção de luz por 1 hora. A absorbância foi determinada em comprimento de onda a 765 nm em espectrofotômetro UV-VIS. Soluções de ácido gálico de 4,0 a 16,0 mM foram usadas para a curva analítica. Os resultados foram expressos em mg equivalente de ácido gálico por g de amostra (mg EAG.g⁻¹).

2.6.2. Ensaio pelo método DPPH

A redução do radical livre 2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) foi determinada pela mudança colorimétrica medida a 517 nm, através de metodologia descrita por Brand-Williams; Cuvelier e Berset, (1995) com adaptação de Casagrande, et al. (2007). Para a reação, misturou-se 1 mL de tampão fosfato 0,1 M (pH 5,5), 1 mL de etanol absoluto, 50 µL de amostra e 0,5 mL de solução 250 µM DPPH. As misturas foram mantidas ao abrigo da luz durante 15 minutos, em seguida, as absorbâncias foram lidas em espectrofotômetro. O controle positivo foi preparado sem a amostra e indica o máximo de doação de elétrons do radical DPPH. O branco foi preparado com a mistura sem a solução DPPH, sem a amostra e com 50 µL do solvente extrator utilizado. Soluções de etanol com concentrações conhecidas de Trolox (100 a 1.000 µM) foram usadas para a curva analítica. Os resultados da atividade antioxidante foram expressos em mg equivalente de Trolox por g de amostra (mgET. g⁻¹).

2.6.3. Capacidade de sequestro de radical livre estável ABTS

O método utilizado está de acordo com proposto por Re et al. (1999) e adaptado por Sánchez-González, Jiménez-Escrig, Saura-Calixto (2005). O radical cátion do composto 2,2-azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) foi produzido através da reação em ambiente escuro, por 16 horas, à temperatura ambiente, de 7mM da solução estoque ABTS com 2,45 mM de persulfato de potássio. A solução ABTS^{•+} foi diluída com tampão fosfato (pH 7,4, 20 mM) para uma absorbância de 0,700 em comprimento de onda de 730 nm. A reação se deu com a adição de 10 µL de amostra em 4 mL da solução ABTS^{•+} diluída. As leituras de absorbância foram realizadas após 6 minutos de reação. Soluções de etanol com concentrações conhecidas de Trolox (0,75 a 7,5 µM) foram usadas para a curva analítica. Os resultados da atividade antioxidante foram expressos em mg equivalente de Trolox por g amostra (mgET. g⁻¹).

2.6.4. Método de redução de íons de ferro (FRAP)

O método utilizado foi de acordo com Benzie e Strain (1999). O reagente FRAP foi preparado pela mistura de 2,5 mL de uma solução 10 mM TPTZ (2,4,6-tripiridil-s-triazina) em 40 mM HCl, 2,5 mL de 20 mM cloreto de ferro (FeCl₃.6H₂O) e 25 mL de 0,3 mM tampão acetato em pH 3,6. A solução foi incubada a 37 °C por 30 minutos.

Para a reação, uma alíquota de 30 μL de cada extrato, 90 μL de água ultra-pura e 900 μL do reagente FRAP foram misturados em ambiente escuro e mantidos em banho-maria a 37 °C. A leitura no espectrofotômetro foi realizada a 595 nm após 30 minutos de reação. Como branco, foram utilizados 900 μL do reagente de FRAP e 100 μL de água ultra-pura. Soluções de etanol com concentrações conhecidas de Trolox (50 a 600 mM) foram usadas para a curva analítica. Os resultados da atividade antioxidante foram expressos em mg equivalente Trolox por g amostra (mg ET.g^{-1}).

2.7. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

A farinha de rizoma de cúrcuma e o hidrolisado de cúrcuma e pimenta-do-reino foram avaliados por microscopia eletrônica de varredura (FEI Quanta 200, FEI Company, Holanda) com atmosfera de vácuo de 10^6 torr. As amostras previamente liofilizadas foram montadas em suportes de alumínio com fita de carbono, pulverizadas com um filme de ouro (BALTEC SDC 050, Sputter Coater, Alemanha) e observadas. As eletromicrografias foram geradas em modo topográficos (elétrons secundários) a 9 kV.

2.8. INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)

A transformação tautomérica da curcumina na matriz alimentar da farinha de rizoma de cúrcuma e do hidrolisado de cúrcuma e pimenta-do-reino foi avaliada por FTIR. Os espectros de FTIR das amostras previamente liofilizadas foram obtidos com auxílio de espectrofotômetro IR Prestige – 21 (Shimadzu, Brasil). O número de scans foi de 32 e a faixa de comprimento de onda de 400 a 4000cm^{-1} . As pastilhas de KBr foram preparadas por prensagem, após as amostras serem misturadas com KBr, previamente seco, na proporção de 1/5 (m/m).

2.9. ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

2.9.1. Preparo dos Inóculos Bacterianos

Para determinação da atividade antimicrobiana foram utilizadas cepas de *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Bacillus cereus* (LMUEL), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 13883), *Salmonella* Enteritidis (ATCC 13076), *Salmonella* Typhi (LACEN) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853). As cepas foram cultivadas em caldo infusão cérebro e coração (BHI) por 24 horas. Em

seguida, procedeu-se a padronização do inóculo com o auxílio da escala nefelométrica de McFarland 0.5 para obter uma concentração de 10^8 UFC por mL. A partir desta suspensão, foi realizada uma diluição (1:10) em água peptonada tamponada 0,1 %, para obtenção do inóculo final de 10^7 UFC.mL⁻¹.

2.9.2. Obtenção dos Extratos

Os extratos da farinha de rizoma de cúrcuma e do hidrolizado de cúrcuma e pimenta-do-reino foram obtidos após dissolução em etanol 80%, em agitador orbital a 150 rpm, no escuro e a temperatura ambiente. As amostras foram filtradas e esterilizadas por filtração a vácuo em membrana de 0,22 μ m, até obtenção de um filtrado límpido. Este foi concentrado em rotaevaporador à vácuo a 60 °C até obtenção de um extrato sólido. Este foi ressuspenso em etanol 80% e dissolvido em uma mistura de etanol 80% e dimetil sulfóxido (DMSO) a 10% na proporção de 1:1, até concentração de 10 mg.mL⁻¹.

2.9.3. Concentração Mínima Inibitória (CMI)

A CMI foi determinada pelo método de macrodiluição em caldo, através de metodologia proposta por Chakraborty, et al. (2014) com adaptações. As concentrações dos extratos da farinha de rizoma de cúrcuma e do hidrolizado de cúrcuma e pimenta-do-reino testadas foram 0,25; 0,5; 1,0; 1,25 e 2,0 % (v/v). Foram inoculados 100 μ L de cada suspensão bacteriana em tubos contendo alíquotas das diferentes concentrações de cada extrato e caldo Müller-Hinton (MH) até volume final de 5 mL. Os tubos foram incubados a 37 °C por 24 horas, e após este período, foram inspecionados visualmente. Tubos com aspecto límpido demonstram ausência de crescimento microbiano. A CMI é considerada a menor concentração do extrato capaz de inibir o crescimento microbiano. Todos os testes foram realizados em triplicata.

2.9.4. Concentração Bactericida Mínima (CBM)

A determinação da concentração bactericida mínima (CBM) foi obtida pela semeadura de 0,1 mL de cada tubo utilizado para a determinação da CMI (tubos com ausência de crescimento bacteriano) em placas contendo ágar MH. Após 24 horas de incubação a 37 °C foi considerada como CBM a menor concentração de

extrato que inibiu completamente o desenvolvimento dos microrganismos testados. Todos os testes foram realizados em triplicata.

2.10. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todas as análises foram feitas em triplicatas e seus resultados expressos em média \pm desvio padrão (DP) e analisados por meio de análise de variância (ANOVA). Diferenças foram avaliadas usando o teste-t com ajuste de Tukey, em nível de significância de 0,05. As correlações entre os dados obtidos foram calculadas usando o coeficiente de correlação de Pearson (r), em nível de significância de 0,05. O *software* utilizado foi o Statistica versão 10.0 (StatSoft, EUA).

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1. COMPOSIÇÃO FÍSICO QUÍMICA

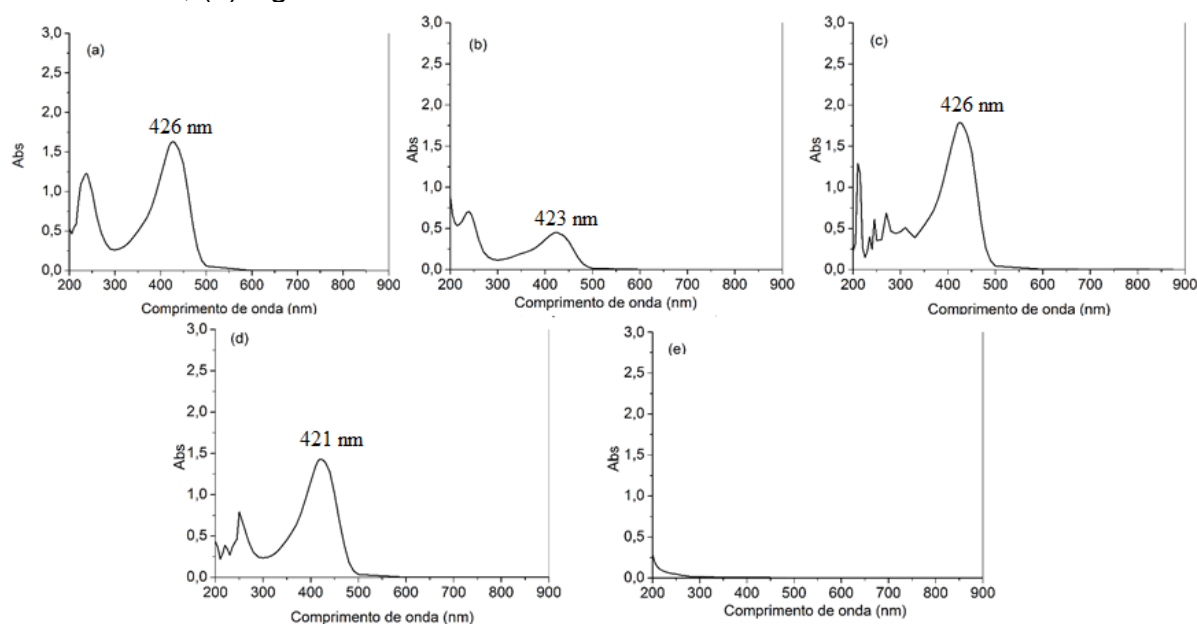
A farinha do rizoma de cúrcuma apresentou $10,28 \pm 0,19$ g 100 g⁻¹ de umidade, $3,75 \pm 0,02$ g 100 g⁻¹ de cinzas, $7,29 \pm 0,12$ g 100 g⁻¹ de proteínas, $2,90 \pm 0,18$ g 100 g⁻¹ de lipídeos, $1,66 \pm 0,10$ g 100 g⁻¹ de fibras totais, $1,05 \pm 0,06$ g 100 g⁻¹ de açúcar redutor, $19,50 \pm 0,05$ g 100 g⁻¹ de açúcar total, $59,23 \pm 1,19$ g 100 g⁻¹ de amido total, $4,18 \pm 0,01$ g 100 g⁻¹ de teor de curcumina (extraído em ácido acético glacial), pH de $6,03 \pm 0,01$. A pimenta-do-reino apresentou $10,07 \pm 0,15$ g 100 g⁻¹ de umidade, $6,91 \pm 0,06$ g 100 g⁻¹ de cinzas, $8,79 \pm 0,35$ g 100 g⁻¹ de proteínas, $2,05 \pm 0,04$ g 100 g⁻¹ de lipídeos e $72,20$ g 100 g⁻¹ de carboidrato. Resultados expressos em base seca.

Os resultados de composição físico-química da farinha de rizoma de cúrcuma e da pimenta-do-reino estão de acordo com o relatado na literatura para produtos comercializados a granel (MANIGLIA, et al., 2015). O maior componente da farinha do rizoma de cúrcuma foi o amido ($59,23$ g 100 g⁻¹), assim, este rizoma torna-se uma matéria-prima com potencial para a extração e aplicação do seu amido, por exemplo, em produção de biofilmes (MANIGLIA, et al., 2014), na matriz para encapsulação de ingredientes alimentares (SARI, et al., 2015) e na produção de hidrolisado e produtos fermentados.

3.2. EXTRAÇÃO DE CURCUMINA EM DIFERENTES SOLVENTES

A Figura 1 mostra os espectros do UV-VIS no estudo da extração de curcumina com os diferentes solventes que foram selecionados a partir da literatura sobre o assunto (AKINOLA, et al., 2014; JHA, et al.; 2015; GUPTA, et al., 2015; HUANG, et al., 2016).

Figura 1 - Espectro de varredura UV-Vis para diferentes extratos de curcumina: (a) Etanol 800 mL.L-1; (b) Metanol 800 mL.L-1; (c) Acetona 800 mL.L-1; (d) Ácido acético 1000 mL.L-1; (e) Água.



Fonte: o próprio autor.

Os picos obtidos nas extrações variaram de 421 a 426 nm, valores correspondentes ao comportamento da molécula de curcumina em solventes polares (PRIYADARSINI, 2009), com exceção na extração em meio aquoso onde não se observa pico de absorção no espectro UV-VIS. Esses valores de comprimento de onda não coincidem com os utilizados para a determinação da capacidade antioxidante pelos métodos DPPH, ABTS e FRAP e determinação de teor de polifenólicos totais, e desta forma, supõe-se não há interferência da matriz da amostra.

A variação no comprimento de onda de absorção máxima (421 a 426 nm) pode ser explicado pelo efeito solvatocrômico sofrido pela curcumina, ou seja, ao se modificar a polaridade do solvente observou-se um deslocamento do pico. Este mesmo comportamento foi relatado por Sueth-Santiago et al. (2015).

A Tabela 1 mostra os valores encontrados para pH, quantificação de curcumina por CLAE, teor de polifenólicos totais e atividade antioxidante para a farinha de rizoma de cúrcuma extraído em diferentes solventes.

Tabela 1 - Atividade antioxidante pelas metodologias DPPH, ABTS e FRAP, Polifenólicos Totais, pH e quantificação de curcumina por CLAE obtidos nos diferentes solventes de extração.

Solvente	pH	Teor Curcumina	Polifenólicos Totais	Atividade Antioxidante		
				DPPH	ABTS	FRAP
Etanol 80%	6,61 ^b ±0,02	3,14 ^c ±0,01	16,00 ^a ±0,12	10,48 ^a ±0,54	9,24 ^a ±0,67	2,68 ^b ±0,10
Metanol 80%	6,82 ^a ±0,02	3,90 ^b ±0,06	5,68 ^c ±0,08	6,72 ^{bc} ±0,40	4,49 ^b ±0,08	0,90 ^c ±0,02
Acetona 80%	6,62 ^b ±0,02	3,11 ^c ±0,03	12,18 ^b ±0,36	7,88 ^b ±0,40	9,80 ^a ±0,43	2,94 ^a ±0,07
Água	5,71 ^c ±0,01	0,01 ^d ±0,00	0,70 ^d ±0,04	0,11 ^d ±0,01	0,53 ^c ±0,08	0,09 ^d ±0,00
Ácido Acético	1,47 ^d ±0,03	4,18 ^a ±0,01	12,19 ^b ±0,34	6,48 ^c ±0,40	4,84 ^b ±0,51	2,54 ^b ±0,04

Valores expressos como média±DP (n=3). Diferentes letras dentro das colunas indicam diferença significativa ($p < 0,05$). Resultados expressos em g curcumina. 100 g⁻¹ de cúrcuma para teor de curcumina por CLAE; em mg EAG. g⁻¹ de farinha de rizoma de cúrcuma para determinação de Polifenólicos Totais e g ET.100 g⁻¹ de farinha de rizoma de cúrcuma para para DPPH, ABTS e FRAP.

O pH do meio é importante na estabilidade da curcumina, logo os solventes são fundamentais para a extração e manutenção da molécula. A curcumina é estável a pH ácido, mas instável a pH neutro e básico (GOEL, et al., 2008; PRIYADARSINI, 2009; ESATBEYOGLU, et al., 2012). Wang, et al. (1997) mostraram que, em média, 90% de curcumina é rapidamente degradada em sistemas tampão fosfato de pH 7,2. Price e Buescher (1997), ao estudarem a cinética da degradação alcalina da curcumina, constataram que a molécula pode sofrer degradação química em pH entre 7,5 a 10,2. No presente estudo, os solventes foram testados de modo a minimizar a degradação da molécula uma vez que o pH na extração para cada solvente, variou entre 1,47 a 6,82.

Ao comparar os resultados estatísticos do teor de curcumina em relação aos solventes extratores, obteve-se que apenas o etanol e a acetona não apresentaram diferença significativa. A melhor extração de curcumina foi alcançada no solvente ácido acético (4,18 g.100 g⁻¹), seguido de metanol 80% (3,90 g.100 g⁻¹), etanol 80% (3,14 g.100 g⁻¹) e acetona 80% (3,11 g.100 g⁻¹). O comportamento da molécula de curcumina em pH ácido, como o do ácido acético (pH = 1,47), favorece o deslocamento do equilíbrio ceto-enólico para a fração cetônica, causando uma

instabilidade molecular, quando comparada à fração enólica, e isto pode influenciar na atividade antioxidante (PRIYADARSINI, 2009).

Os resultados deste trabalho apontam que os maiores teores de compostos polifenólicos totais extraídos da farinha de rizoma de cúrcuma foram encontrados em ordem decrescente para o solvente etanol 80%, acetona 80% e ácido acético. Os solventes acetona e o ácido acético não apresentaram diferença significativa. Na farinha de rizoma de cúrcuma são encontrados metabólitos secundários que apresentam anel fenólico em sua estrutura, como taninos e flavonóides (Gupta, et al., 2015), além da curcumina. Desta forma, a eficiência de extração destes outros metabólitos secundários pode ter influenciado na extração de compostos polifenólicos totais. O ensaio Folin-Ciocalteu é utilizado como medida de polifenólicos totais em produtos naturais, e determina todas as substâncias fitoquímicas que apresentem em sua estrutura anéis fenólicos (KASOTE, et al., 2015). A correlação entre teor de polifenólicos totais e teor de curcumina foi de apenas 0,67 (Tabela 2), o que reforça a possibilidade da presença de outros compostos polifenólicos na extração.

Tabela 2 – Coeficientes de correlação de Pearson para atividade antioxidante pelas metodologias DPPH, ABTS e FRAP, determinação de compostos Polifenólicos Totais e quantificação de curcumina por CLAE.

	Polifenólicos Totais	ABTS	DPPH	FRAP	Teor de Curcumina
Polifenólicos Totais	1,00	0,85*	0,91*	0,94*	0,67*
ABTS		1,00	0,88*	0,86*	0,55
DPPH			1,00	0,81*	0,78*
FRAP				1,00	0,65*
Teor de Curcumina					1,00

* Significativa ($p < 0,05$).

Os coeficientes de correlação observados entre os teores de compostos polifenólicos totais e os métodos antioxidantes ABTS, DPPH e FRAP assumiram uma relação direta positiva igual a 0,85, 0,91 e 0,94, respectivamente ($p < 0,05$). Esta correlação entre compostos polifenólicos totais e atividade antioxidante também já foi reportada em diferentes estudos com extratos de plantas, onde coeficientes de correlações superiores a 0,9 foram obtidos (DUDONNÉ, et al., 2009; GORINSTEIN et al., 2010, FLOEGEL, et al., 2011).

Não há um método universal para a medida de atividade antioxidante. Diferentes metodologias são aplicadas para estimar de forma *in vitro* a capacidade

antioxidante de um composto (LÓPEZ-ALARCÓN ; DENICOLA, 2013; KASOTE, et al., 2015). Os solventes etanol e acetona foram melhores na extração dos compostos com capacidade antioxidante pelo mecanismo de transferência de elétron, das metodologias ABTS e DPPH. Já para a metodologia de redução do íon férrico do composto TPTZ (FRAP) os melhores solventes extratores foram acetona, etanol e ácido acético.

A combinação das análises *in vitro* para as metodologias antioxidantes e determinação de polifenólicos totais indicam que a presença de compostos fitoquímicos no rizoma de cúrcuma, em especial a curcumina, apresentaram capacidade antioxidante proporcional ao teor de polifenólicos totais extraído. A partir dos resultados obtidos pode-se inferir que a capacidade antioxidante da curcumina atua no combate do estresse oxidativo pelos mecanismos de transferência de átomos de hidrogênio e elétron e leva à estabilização de radical metálico.

A partir dos resultados observados neste item, o etanol foi definido como o solvente a ser usado para extração nas análises de antioxidante e antimicrobianos no estudo.

3.3. PROPRIEDADE DA PASTA DO AMIDO DA FARINHA DE RIZOMA DE CÚRCUMA COM PIMENTA-DO-REINO

A Tabela 3 e a Figura 2 apresentam, respectivamente, os parâmetros da propriedade de pasta e o perfil de viscosidade para a farinha de rizoma de cúrcuma e pimenta-do-reino, na proporção de 100:1.

Tabela 3 - Propriedades de pasta da farinha de rizoma de cúrcuma e pimenta-do-reino.

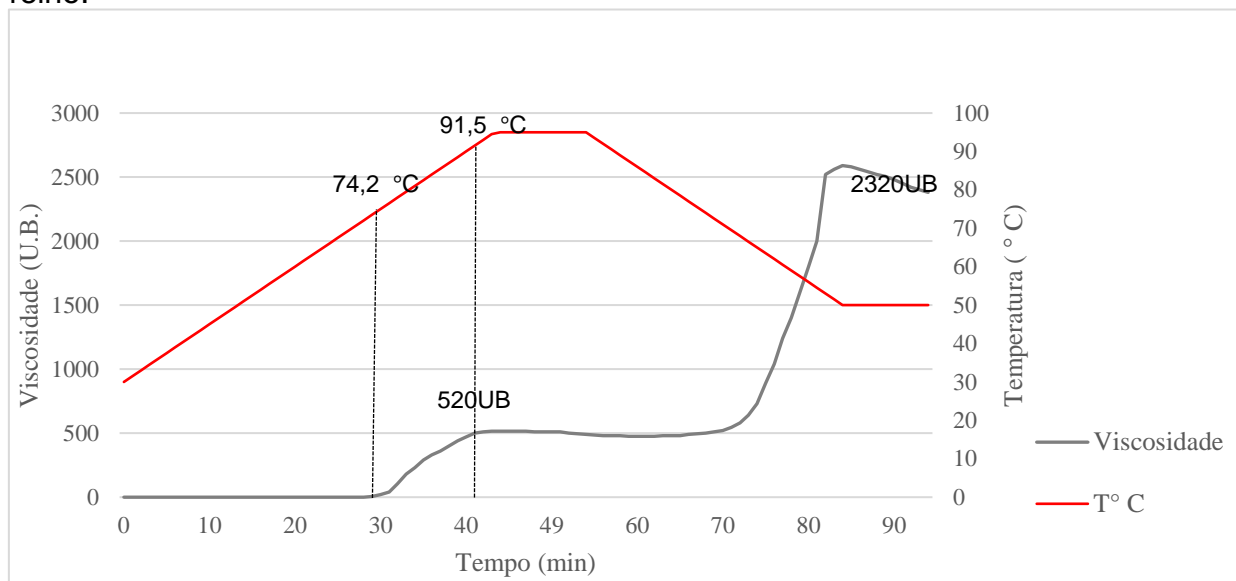
	Temperatura de pasta (°C)	Viscosidade (UB)			
		Pico	Quebra ¹	Final	Setback ²
Cúrcuma e pimenta-do-reino	74,25 ± 1,06	520 ± 14,14	38 ± 0,06	2320 ± 84,85	1800 ± 98,99

UB - Viscosidade em Unidades Brabender

¹Quebra = Viscosidade de Pico – Viscosidade Mínima

² Setback = Viscosidade Final – Viscosidade de Pico

Figura 2 - Perfil amilográfico da pasta da farinha de rizoma de cúrcuma e pimenta-do-reino.



UB - Viscosidade em Unidades Brabender

Fonte: o próprio autor.

Perfil viscoamilográfico semelhante ao encontrado neste trabalho foi descrito por Leonel et al. (2003) e Jyothi et al. (2003) em estudo de *Curcuma longa* e *Curcuma Zedoaria*, respectivamente. Os grânulos de amido sofrem o processo de gelatinização quando aquecidos em excesso água. Neste processo, há a absorção da água e o inchamento do grânulo até a ruptura da ordem molecular em seu interior. A temperatura de pasta é obtida no momento em que o equipamento registra a primeira resistência ao torque em função do inchamento dos grânulos de amido, resultando em aumento da viscosidade. A temperatura de pasta determinada foi igual a 74,25 °C. Com o aquecimento contínuo e a aplicação constante da força de cisalhamento, os grânulos de amido continuam a inchar, até atingir a viscosidade de pico, que foi de 520 UB. A temperatura no pico de viscosidade foi de 91,5 °C. Desta forma, trabalhar em temperaturas iguais ou superiores a de 91,5 °C garante uma maior disponibilidade do amido ao ataque enzimático (COPELAND, et al., 2009). O baixo valor da viscosidade de quebra (48 UB) mostra que a pasta da farinha de rizoma de cúrcuma e pimenta-do-reino apresenta alta estabilidade ao aquecimento e agitação mecânica, já o alto valor de viscosidade de *setback* (2083 UB) indica a alta tendência à reorganização das moléculas de amido de cúrcuma durante o resfriamento.

3.4. HIDRÓLISE ENZIMÁTICA

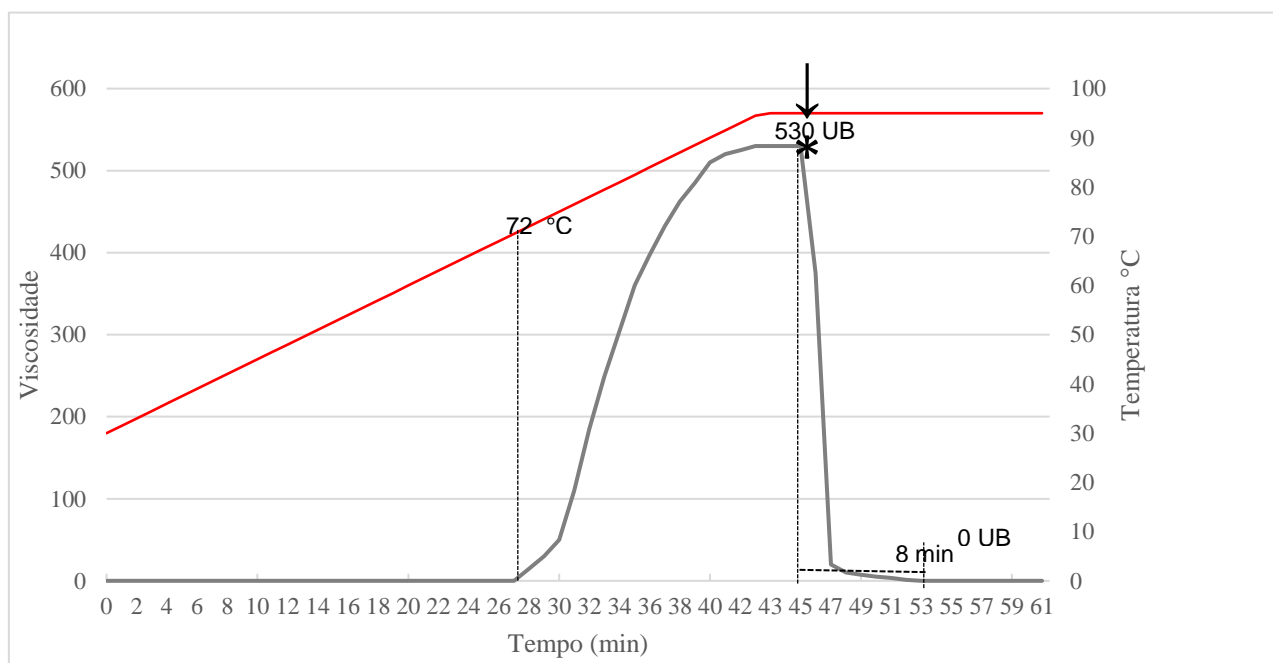
3.4.1. Determinação do Tempo de Liquefação e Sacarificação

O tempo necessário para as etapas de hidrólise enzimática (liquefação e sacarificação) foram determinados considerando-o um fator independente das variáveis, pH, temperatura e concentração de enzima em relação ao substrato (amido de cúrcuma). O tempo foi determinado de acordo com a maior resposta de açúcar redutor expressa em DE (teor de dextrose equivalente).

Na etapa de liquefação o pH do sistema foi de $6,03 \pm 0,15$ sem necessidade de correção. A temperatura foi fixada em valor superior à temperatura da viscosidade de pico ($91,5 \text{ }^\circ\text{C}$) garantindo assim a total gelatinização dos grânulos de amido. Tanto o pH quanto a temperatura encontraram-se na faixa ótima de atuação da enzima α -amilase. A concentração de enzima foi de $0,17 \text{ mg}$ por 100 g de amido de cúrcuma (NOVOZYME, 2015).

O comportamento da viscosidade da suspensão da farinha de rizoma de cúrcuma e pimenta-do-reino foi monitorado graficamente utilizando um Viscoamilógrafo, e está apresentado na Figura 3.

Figura 3 – Perda de viscosidade durante a etapa de liquefação.



UB - Viscosidade em Unidades Brabender

— Temperatura — Viscosidade

↓ Indica o momento de adição da enzima α -amilase no hidrolisado.

Fonte: o próprio autor.

Na Figura 3 observa-se a gelatinização do amido da suspensão, com o início do aumento da viscosidade na temperatura de pasta (72°C) até a viscosidade de pico (530 UB) a 91,5 °C. Após aplicação da enzima α -amilase (Figura 3↓) houve a total liquefação do meio, isto pode ser observado no gráfico pela queda de viscosidade de 530 para 0 UB, em uma fração de tempo menor que 10 minutos.

Spinosa et. al. (2016), na liquefação de quirera de arroz, obtiveram um tempo igual a 22 minutos e DE de 14,69% aplicando a mesma enzima a temperatura de 89 °C e concentração de α -amilase igual a 0,21 por 100g de amido. Já Torres et. al. (2012), em estudo de hidrolisado de gengibre, fixou o tempo de 2 horas de liquefação variando a temperatura de 95 a 105°C, aplicando a mesma enzima α -amilase comercial. Como os valores de tempo encontrados na literatura eram sempre superiores ao encontrado neste trabalho, o processo de liquefação do hidrolisado de cúrcuma com pimenta-do-reino foi acompanhado após os 10 minutos de aplicação da enzima. O intervalo de 10 até 60 minutos de liquefação foi monitorado com o intuito de verificar se a ação da enzima α -amilase, e consequente rompimento das cadeias de amido, chegava ao teor máximo de DE quando a queda de viscosidade fosse total. Os teores de DE variaram de 4,23% \pm 0,30 no tempo 10 minutos a 4,87% \pm 0,60 no tempo de 60 minutos e não foi houve diferença significativa ($p < 0,05$), nos diferentes intervalos de tempo. Assim, definiu-se que 10 minutos era o tempo ideal para a liquefação. Valor considerado vantajoso para aplicações industriais gerando não só economia de tempo, mas de custos de processos, como gasto energéticos e mão de obra.

A etapa de sacarificação envolve o uso da enzima amiloglucosidase, sua aplicação converte as cadeias de amido, previamente, degradadas pela ação da α -amilase. Os fatores concentração de enzima em relação ao substrato, pH e temperatura foram fixados em 0,3 mL.100 g⁻¹, 4,50 e 60 °C, respectivamente (NOVOZYME, 2015).

A extensão da sacarificação foi avaliada nos tempos: 4, 8, 12, 24 e 48 horas, através da determinação dos teores de DE (Tabela 4).

Tabela 4 - Teor de dextrose equivalente (DE) em diferentes tempos da etapa de sacarificação

Tempo (h)	DE (%)
0	4,87 ± 0,60 ^d
4	69,55 ± 2,57 ^c
8	98,91 ± 2,11 ^a
12	86,05 ± 6,03 ^b
24	66,99 ± 1,99 ^c
48	66,73 ± 4,10 ^c

Valores expressos como média ± DP (n=3). Diferentes letras dentro das colunas indicam diferença significativa ($p < 0,05$), aplicado teste de médias de Tukey.

Leonel e Cereda (1999) obtiveram um rendimento de 63,42% de conversão de amido de farelo de mandioca em dextrina, utilizando as mesmas enzimas comerciais, em um processo de sacarificação de 24 horas, já Silva et al. (2010) obtiveram valores próximos a 100% na hidrólise enzimática de mandioca, também em 24 horas de sacarificação. Neste estudo, para a hidrólise da farinha de rizoma de cúrcuma e pimenta-do-reino o maior teor de DE foi de 98,91%, obtido ao final de 8 horas, tempo determinado como ideal para a sacarificação. Esta condição foi adotada como ideal para a sacarificação. A partir deste tempo, os teores de DE decresceram ($p < 0,05$). A queda no teor de DE pode ser atribuída a alta concentração de glicose no meio. É pouco provável que tenha ocorrido contaminação microbiana durante o processo de hidrólise, pois a etapa de liquefação, realizada a 95 °C, pode ter reduzido a presença de microrganismos contaminantes e na etapa de sacarificação, realizada a 60 °C durante 8h, quando o maior teor de DE foi registrado, também inibe o desenvolvimento de microrganismos. A queda no teor de DE pode ser atribuída a alta concentração de glicose no meio. Uma solução supersaturada pode ter sido gerada, onde parte do açúcar produzido precipitou e não foi quantificado.

3.4.2. Otimização da concentração enzimática na hidrólise

Um delineamento experimental foi usado para otimizar a concentração das enzimas α -amilase e amiloglicosidase nas etapas de liquefação e sacarificação da hidrólise enzimática. A Tabela 5 apresenta os resultados para a hidrólise do farinha de rizoma de cúrcuma e pimenta-do-reino.

Tabela 5 - Matriz do delineamento experimental para otimização da concentração enzimática na hidrólise e teores de DE obtidos.

Tratamento	Variáveis Codificadas		Variáveis Independentes		Variável Dependente
	X ₁	X ₂	α-amilase (g.100g amido ⁻¹)	amiloglucosidase (mL.100g amido ⁻¹)	Y % (DE)*
1	-1	-1	0,07	0,55	63,12
2	-1	1	0,07	1,85	87,96
3	1	-1	0,27	0,55	82,18
4	1	1	0,27	1,85	100,00
5	-1,4142	0	0,03	1,20	84,52
6	1,4142	0	0,31	1,20	100,00
7	0	- 1,4142	0,17	0,28	74,90
8	0	1,4142	0,17	2,12	100,00
9	0	0	0,17	1,20	96,63
10	0	0	0,17	1,20	100,00
11	0	0	0,17	1,20	96,83
12	0	0	0,17	1,20	99,37
13	0	0	0,17	1,20	98,75

* % de conversão de amido em açúcares redutores (dextrose)

Um modelo de regressão polinomial quadrático foi obtido através do delineamento experimental e está apresentado pela Equação 2. Na equação canônica ajustada aos dados experimentais, a variável dependente Y é dada pelo teor de DE, e os termos significativos em nível de 5% são indicados por asterisco.

$$Y = 98,31^* + 6,62^* X_1 - 4,66^* X_1^2 + 9,77^* X_2 - 7,07^* X_2^2 - 1,76 X_1 X_2 \quad \text{Equação 2}$$

De acordo com a Equação 2, os termos significativos para o modelo ($p < 0,05$) foram os termos lineares e quadráticos das duas variáveis, X₁ e X₂. Entre os termos significativos, os termos lineares apresentaram influência positiva e o termo quadrático influência negativa para a resposta DE (Y). A interação X₁.X₂ (entre as enzimas α-amilase e amiloglucosidase) não foi significativa. Os coeficientes de determinação experimental (R²) e ajustado (R²_{ajuste}), foram de 93,37 e 88,64%, respectivamente. Foi, então, gerado um novo modelo, eliminando a interação não significativa, e este é apresentado na Equação 3, e definido como modelo reparametrizado.

$$Y = 98,31^* + 6,62^* X_1 - 4,66^* X_1^2 + 9,77^* X_2 - 7,07^* X_2^2 \quad \text{Equação 3}$$

A qualidade do ajuste da equação do modelo reparametrizado foi verificada através de análise de variância (ANOVA). Os resultados estão expressos na Tabela 6, onde p-valor inferior a 0,05 indica que o termo foi significativo.

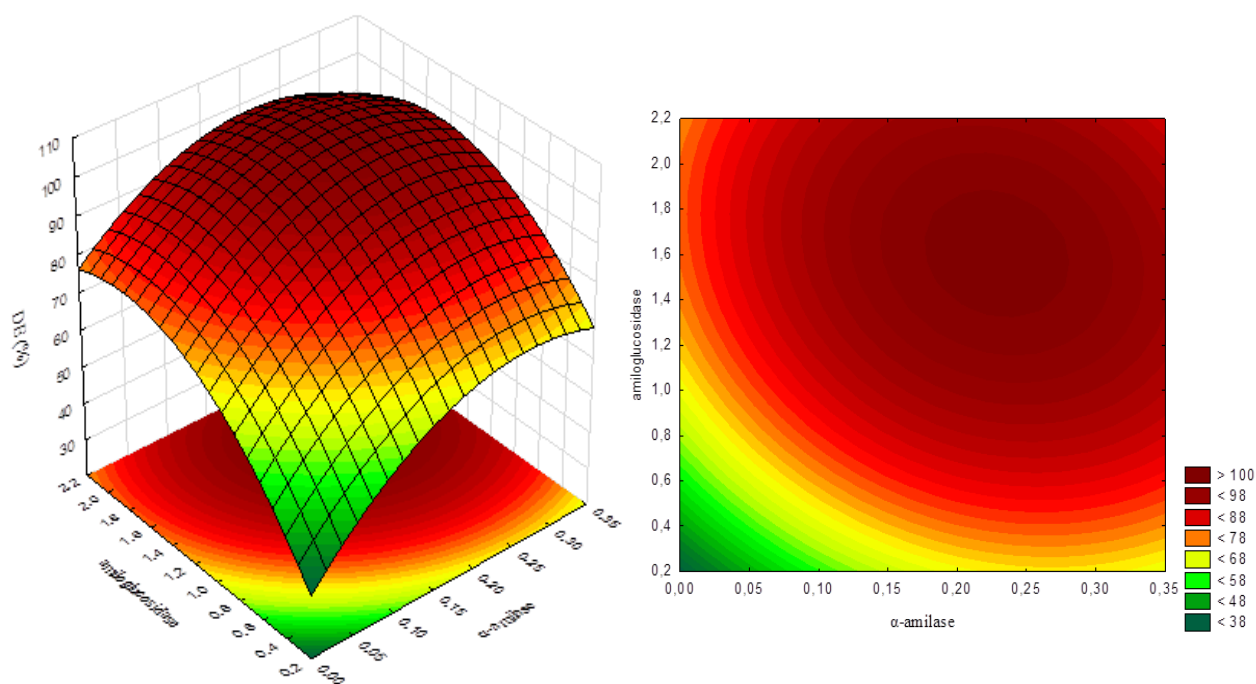
Tabela 6 - ANOVA para os teores de DE obtidos na otimização da concentração enzimática na hidrólise.

	Soma de Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	F- calculado	p- valor
X₁ (L)	351,10	1	351,10	152,95	0,000
X₁ (Q)	151,22	1	151,22	65,88	0,001
X₂(L)	763,75	1	763,75	332,71	0,000
X₂ (Q)	347,47	1	347,47	151,37	0,000
Falta de Ajuste	114,87	4	28,72	12,51	0,015
Erro Puro	9,18	4	2,30		
Total SS	1685,39	12			

O coeficiente de correlação (R^2) calculado foi 92,64%. A falta de ajuste não foi significativa ($p = 0,015$) considerando-se $p < 0,05$, valor tido como aceitável devido à grande variabilidade inerente aos bioprocessos que envolvem enzimas (BURKERT, et al., 2005).

A superfície de resposta (Figura 4.A) indica que maiores concentrações das enzimas geram maiores teores de DE. No entanto, uma concentração enzimática ótima pode ser observada no gráfico de curvas de contorno 2D (Figura 4.B). Para as enzimas α -amilase e amiloglucosidase os valores ótimos de concentração de enzima em relação ao substrato foram de 0,23 g.100 g⁻¹ e 1,60 mL.100g⁻¹, respectivamente, gerando um teor de DE máximo de 100%.

Figura 4 - Superfície de resposta 3D (A) e curvas de contorno 2D (B) para o teor de dextrose equivalente (DE) em função da concentração de enzima em relação ao substrato (amido de cúrcuma) para α -amilase e amiloglicosidase.



Fonte: o próprio autor.

A taxa e extensão da hidrólise amilolítica de amidos granulares varia de acordo com a origem botânica (COPELAND, et al., 2009). Torres et. al. (2012) obtiveram rendimentos de até 75,66% na hidrólise de gengibre, Spinoso et. al. (2016) valores de 75,46% na hidrólise de quirera de arroz, ambos utilizando as mesmas enzimas comerciais deste trabalho, e Silva et al. (2010) 100% na hidrólise de mandioca utilizando enzimas produzidas por microrganismos isolados do solo do cerrado brasileiro. Desta forma, é possível verificar que o amido da cúrcuma foi bastante suscetível à ação enzimática. O sinergismo entre as duas enzimas, associada às condições da gelatinização, temperatura e pH durante os processos de hidrólise (liquefação e sacarificação) garantiram total acesso das enzimas aos grânulos do amido de cúrcuma, resultando em um hidrolisado com teores de DE próximos a 100%.

O teor máximo de DE foi calculado pelo modelo polinomial (Equação 3) com os valores ótimos de concentração de enzima determinados através do delineamento experimental. Este resultado foi comparado com o obtido experimentalmente nas condições consideradas ideais. O modelo foi válido dentro do intervalo de confiança de 95%, com valor de $p = 0,0187$.

3.4.3. Perfil dos açúcares obtidos na hidrólise de cúrcuma com pimenta-do-reino

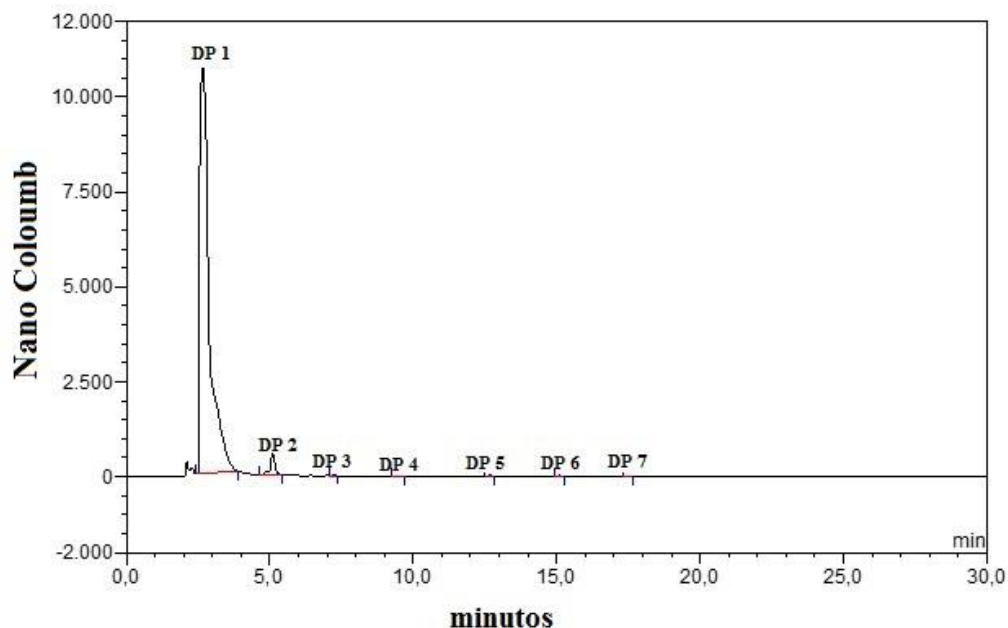
O perfil de açúcares contidos no hidrolisado de cúrcuma e pimenta-do-reino está apresentado na Figura 5. A proporção dos açúcares produzidos encontra-se na Tabela 7. Os resultados indicam que as enzimas α -amilase e amiloglucosidase tiveram atuação efetiva nas condições ótimas de hidrólise, rompendo praticamente todas ligações glicosídicas α -1,4 e a α -1,6 das cadeias do amido do rizoma de cúrcuma. O amido foi convertido em um hidrolisado com teor de DE de 100%, onde 97,43% eram glicose (DP1) e 2,31% maltose (DP2), não restando dextrinas e nem cadeias de oligossacarídeos.

Tabela 7 - Proporção de açúcares obtidos no hidrolisado de cúrcuma e pimenta do reino.

Açúcar	Tempo de Retenção (min)	%
DP1	2,67	97,43
DP2	5,10	2,31
DP3	7,27	0,05
DP4	9,43	0,04
DP5	12,70	0,06
DP6	15,10	0,09
DP7	17,48	0,02
		100,00

DP – Grau de Polimerização

Figura 5- Cromatograma de eluição dos açúcares contidos no hidrolisado de cúrcuma e pimenta-do-reino.



nC -Nano Coloumb

Fonte: o próprio autor.

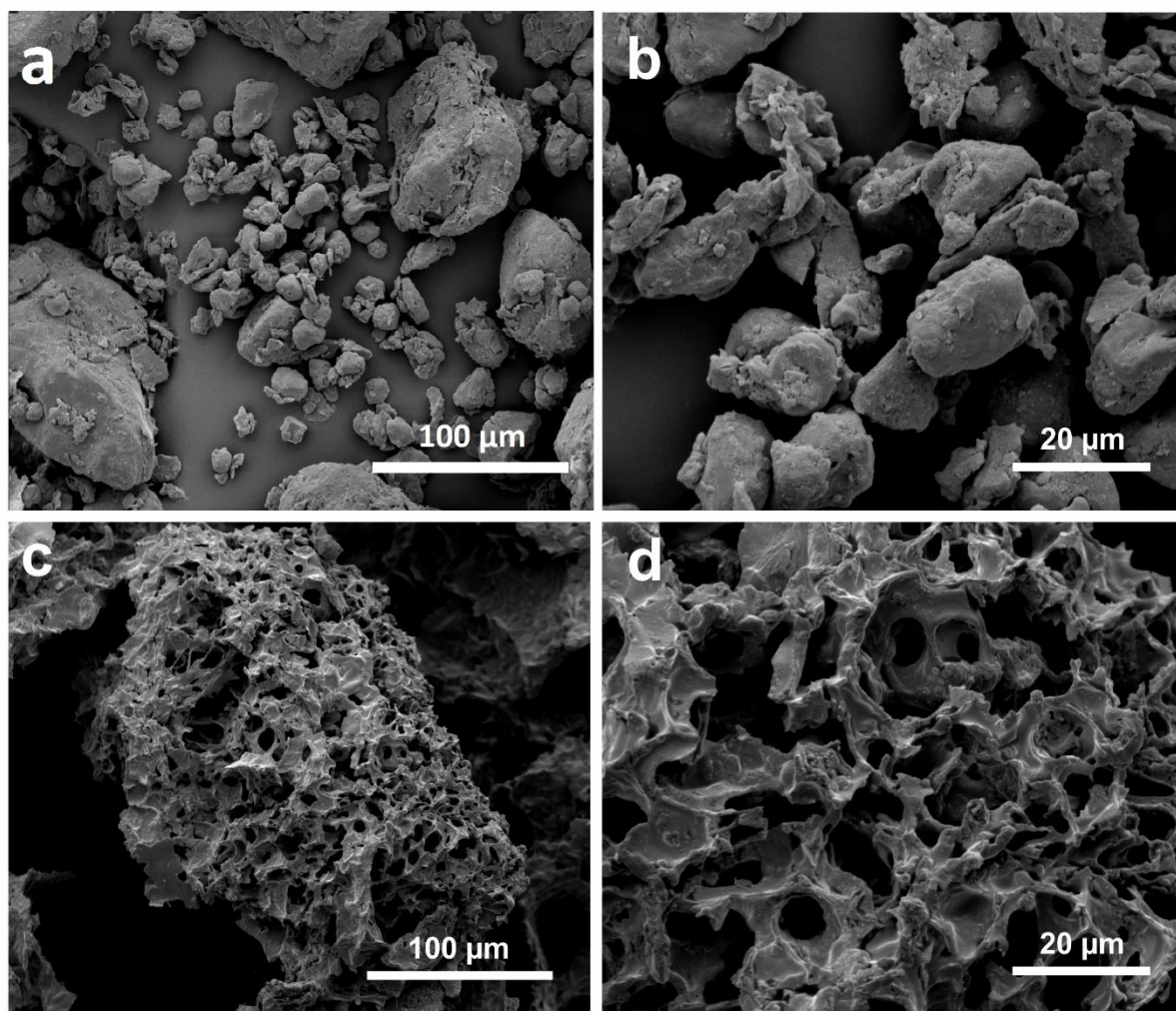
3.5. MORFOLOGIA DA FARINHA DE RIZOMA DE CÚRCUMA E DO HIDROLISADO DE CÚRCUMA E PIMENTA-DO-REINO

Micrografias foram obtidas em microscópio eletrônico de varredura do rizoma de cúrcuma *in natura* e do hidrolisado de cúrcuma e pimenta-do-reino (Figura 6). Na Figura 6.a foi possível observar a matriz da farinha do rizoma de cúrcuma, observando-se grânulos de amido envoltos por proteínas e fibras. Os grânulos de amido de cúrcuma apresentaram tamanhos próximos a 20 μm , formatos irregulares com superfície rugosa (Figura 6.b), provavelmente devido à interação dos grânulos com fibras, proteínas e lipídeos. Já Leonel, Sarmiento e Cereda (2003) visualizaram grânulos de amido de cúrcuma predominantemente triangulares e de tamanho variável. É possível que as diferenças observadas sejam devidas ao modo de extração do amido pois, Leonel, Sarmiento e Cereda (2003) isolaram o amido por moagem úmida, enquanto que neste trabalho, o amido não foi isolado e o que se visualizou foi uma farinha comercial obtida da moagem de rizomas de cúrcuma.

Após tratamento enzimático, foi observado que a estrutura granular foi completamente degradada (Figura 6.c e 6.d). Assim, uma rede fraca pode ser visualizada em função da ação das enzimas α -amilase e amiloglicosidase. É possível concluir que a hidrólise enzimática causou alteração morfológica da matriz, pois esta

ficou altamente fragmentada e com diversos poros, demonstrando a intensa atividade enzimática sobre os grânulos de amido.

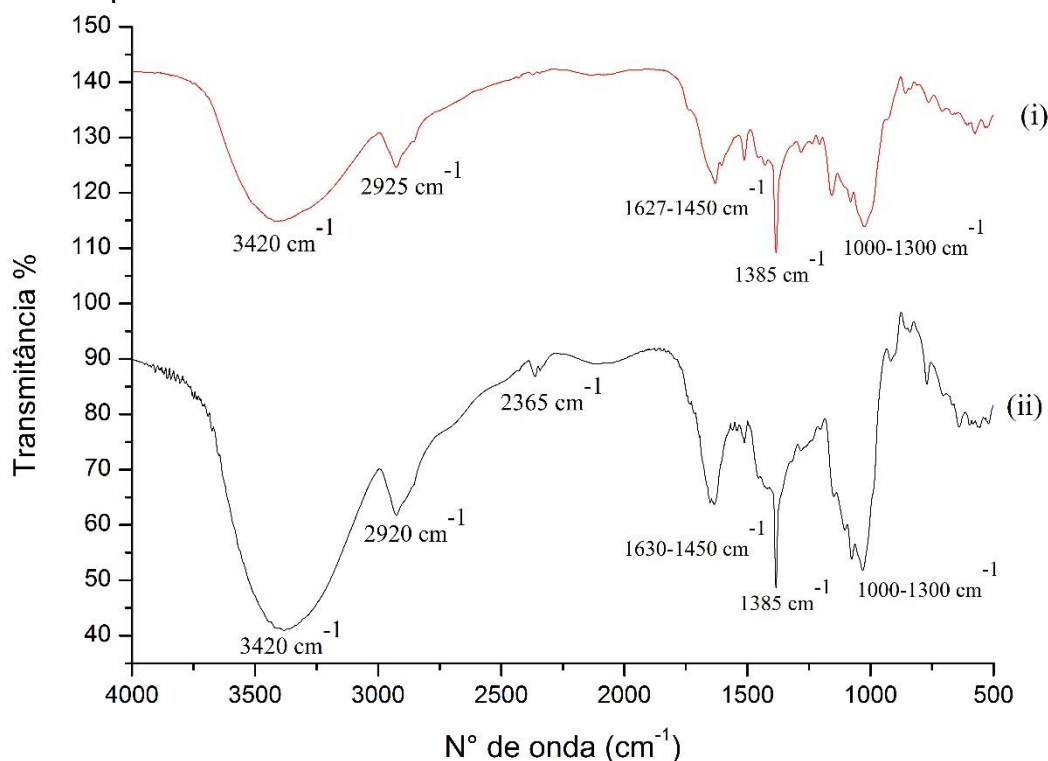
Figura 6 - Micrografias eletrônicas da farinha de cúrcuma *in natura* e do hidrolisado de cúrcuma e pimenta-do-reino. a: cúrcuma *in natura* em 800 x. b: cúrcuma *in natura* em 3000 x. c: hidrolisado de cúrcuma e pimenta-do-reino em 800 x. d: hidrolisado de cúrcuma e pimenta



3.6. INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)

A Figura 7 mostra os espectros de FTIR da farinha de rizoma de cúrcuma e do hidrolisado de cúrcuma e pimenta-do-reino.

Figura 7 - Espectro de FTIR de (i) farinha de rizoma de cúrcuma e (ii) hidrolisado de cúrcuma e pimenta-do-reino.



Comparando os espectros pode-se observar que ambos apresentam bandas similares, com o pico largo em torno de 3420 cm^{-1} indicando a presença de hidroxilas, o pico $2925\text{-}2920\text{ cm}^{-1}$ a hidroxila do enol e o pico de 1385 cm^{-1} o grupamento metil do fenol. Todas essas ligações podem ser encontradas nos diversos constituintes, como amido e proteína, das matrizes alimentares estudadas. O perfil observado apresenta espectros que também correspondem à molécula de curcumina, assim como os encontrados em diferentes estudos de curcumina isolada (KOLEV, et al., 2005; MOHAN et. al., 2012; GANGWAR, et al., 2013, MANGOLIM et al., 2014). As bandas correspondentes a C=O e C=C são observadas na região de $1630\text{-}1450\text{ cm}^{-1}$, e são atribuídas a vibração presente no tautomerismo ceto-enólico (KOLEV, et al; 2005), e entre $1300\text{-}1000\text{ cm}^{-1}$ é observado o grupo C-O-C (KOLEV, et al., 2005; MOHAN et. al., 2012; GANGWAR, et al., 2013). Desta forma, pode-se inferir que a conformação tautomérica da curcumina na cúrcuma *in natura* e no hidrolisado se encontravam na forma ceto-enólica, assim como o observado por Mangolim et al. (2014), ao verificarem que não foram observadas bandas na região carbonílica mais significativas ($1800\text{-}1650\text{ cm}^{-1}$) correspondente à conformação cetônica.

A única exceção foi a banda a 2365 cm^{-1} (Figura 7.ii) observada no hidrolisado. Esta banda não foi verificada em nenhum dos estudos, já citados, de

curcumina isolada. Assim, é provável que esta banda corresponda a ligação -C-H aromáticos proveniente da molécula de piperina presente na pimenta-do-reino. O mesmo foi relatado por Zarai et al. (2013) em espectro de FTIR de piperina isolada. A confirmação da presença de piperina no hidrolisado pode promover maior biodisponibilidade da curcumina, aumentando seus efeitos benéficos no organismo humano (LI, et al., 2015).

3.7. ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

O teor de curcumina, o teor de compostos polifenólicos totais e a atividade antioxidante foram avaliados para a farinha de rizoma de cúrcuma e pimenta-do-reino, e para o hidrolisado de farinha de rizoma de cúrcuma e pimenta-do-reino. A Tabela 8 apresenta os resultados obtidos.

Tabela 8 - Atividade antioxidante pelas metodologias DPPH, ABTS, FRAP, determinação de Polifenólicos Totais e quantificação de curcumina por CLAE do rizoma de cúrcuma, pimenta-do-reino e hidrolisado de cúrcuma e pimenta-do-reino.

Matriz	Teor de Curcumina*	Polifenólicos Totais**	Atividade Antioxidante**		
			DPPH	ABTS	FRAP
Pimenta-do-reino	-	4,38 ^c ±0,10	0,19 ^c ±0,01	0,36 ^c ±0,01	0,84 ^b ±0,05
Cúrcuma	2,58 ^a ±0,05	16,00 ^a ±0,12	10,48 ^a ±0,54	9,24 ^a ±0,67	2,68 ^a ±0,10
Hidrolisado	2,55 ^a ±0,30	12,28 ^b ±0,22	2,06 ^b ±0,24	4,38 ^b ±0,10	2,48 ^a ±0,08

*Extração em acetonitrila

**Em extrato etanólico 80%

Valores expressos como média±DP (n=3), diferentes letras dentro das colunas indicam diferença significativa ($p < 0,05$), Resultados expressos em g curcumina, 100 g⁻¹ de farinha do rizoma de cúrcuma para teor de curcumina por CLAE; em mg EAG, g⁻¹ de farinha do rizoma de cúrcuma para determinação de Polifenólicos Totais e mg ET, g⁻¹ de farinha do rizoma de cúrcuma para DPPH, ABTS e FRAP.

A pimenta-do-reino está presente no hidrolisado em uma proporção 100 vezes menor que a farinha do rizoma de cúrcuma, assim, mesmo apresentando resultados para as atividades antioxidantes e compostos polifenólicos, é possível afirmar que a ação antioxidante observada para o hidrolisado é proveniente principalmente da cúrcuma.

A conformação estrutural da molécula de curcumina do rizoma de cúrcuma e no hidrolisado de cúrcuma e pimenta-do-reino está na forma ceto-enólica (Figura 7). Nesta configuração, a fração enólica atua como um doador de elétrons, além disso, o grupamento fenólico e a porção metoxi também doam elétrons favorecendo reações características da atividade antioxidante (PRIYADARSINI, 2009;

ESATBEYOGLU et al., 2012), Assim, o extrato de cúrcuma e do hidrolisado apresentaram capacidade antioxidante pelos mecanismos de transferência de átomos de hidrogênio e elétrons.

O teor de curcumina no rizoma de cúrcuma e no hidrolisado não diferiram significamente ($p < 0,05$). Não foi observada extração da curcumina em extrato aquoso (Tabela 1). No entanto, no preparo do hidrolisado, o amido foi totalmente convertido em açúcares (Figura 4), o que pode ter contribuído para a liberação da curcumina da matriz de amido. Desta forma, é possível inferir que toda curcumina extraída do rizoma de cúrcuma estava presente no hidrolisado.

Os resultados para a determinação de compostos polifenólicos totais e as atividades antioxidantes pelas metodologias DPPH e ABTS do hidrolisado foram inferiores e diferiram significamente do rizoma de cúrcuma. O hidrolisado foi preparado com a suspensão da farinha de rizoma de cúrcuma em água, e submetido a hidrólise enzimática do amido. Conforme a Tabela 1, a extração em água apresenta baixos teores de compostos polifenólicos totais. Isso mostra que, no hidrolisado, mesmo tendo extraído completamente a curcumina, outros compostos polifenólicos, como taninos e flavonóides, podem não ter sido recuperados. Desta forma, a atividade antioxidante, para DPPH e ABTS, também foram baixas.

A atividade antioxidante pela metodologia FRAP foi significativamente igual entre o extrato de rizoma de cúrcuma e o hidrolisado ($p < 0,05$). É possível que a curcumina seja a responsável pelo mecanismo de redução do íon férrico, pois foi extraída em teores semelhantes no hidrolisado e no extrato de rizoma de cúrcuma.

3.8. ATIVIDADE ANTIMICROBIANA: CONCENTRAÇÃO MÍNIMA INIBITÓRIA (CMI) E CONCENTRAÇÃO BACTERICIDA MÍNIMA (CBM)

A atividade antimicrobiana do extrato etanólico da farinha de rizoma de cúrcuma e do hidrolisado de cúrcuma e pimenta-do-reino foi comprovada e estão descritas na Tabela 9. Todas as linhagens bacterianas estudadas apresentaram sensibilidade aos extratos analisados. Um controle branco foi testado para cada inóculo, nele continha meio de cultura, os solventes puros (etanol 80% e DMSO 10%, 1:1) e cada inóculo teste. Em todos os controles brancos foram observados crescimento microbiano, indicando que não há interferência dos solventes nos resultados antimicrobianos.

Tabela 9 - Concentração Mínima Inibitória (CMI) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) (mg.mL^{-1}) de extrato etanólico da farinha de rizoma de cúrcuma e do hidrolisado de cúrcuma e pimenta-do-reino.

Bactéria	CMI (mg.mL^{-1})									
	Cúrcuma					Hidrolisado				
	0,25	0,5	1,0	1,25	2,0	0,25	0,5	1,0	1,25	2,0
Gram -										
<i>E. coli</i>	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-
<i>S. Enteritidis</i>	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-
<i>S. Typhi</i>	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-
<i>P. aeruginosas</i>	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-
<i>K. pneumonia</i>	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-
Gram +										
<i>S. aureus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. cereus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Bactéria	CBM (mg.mL^{-1})									
	Cúrcuma					Hidrolisado				
	0,25	0,5%	1,0%	1,25%	2,0%	0,25%	0,5%	1,0%	1,25%	2,0%
Gram -										
<i>E. coli</i>	*	*	+	+	-	*	*	+	+	-
<i>S. Enteritidis</i>	*	*	+	+	-	*	*	+	+	-
<i>S. Typhi</i>	*	*	+	+	-	*	*	+	+	-
<i>P. aeruginosas</i>	*	*	+	-	-	*	*	+	-	-
<i>K. pneumonia</i>	*	*	+	+	-	*	*	+	+	-
Gram +										
<i>S. aureus</i>	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-
<i>B. cereus</i>	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-

Legenda: (+) crescimento microbiano, turvação do meio para CMI e placas de petri com crescimento de colônias para CBM, (-) sem crescimento, meio sem turvação para CMI e placas de petri sem crescimento de colônia para CBM, * Concentração não avaliada em CBM por ser positiva em CMI.

A concentração mínima inibitória (CMI) tanto do extrato da farinha de rizoma de cúrcuma quanto do hidrolisado de cúrcuma e pimenta-do-reino foi igual a $1,00 \text{ mg.mL}^{-1}$ para as bactérias Gram-negativas e $0,50 \text{ mg.mL}^{-1}$ para as bactérias Gram-positivas. A CMI para as bactérias Gram-negativas foi superior as bactérias Gram-positivas, possivelmente pela presença de uma membrana externa com dupla camada fosfolipídica que é capaz de restringir a penetração de substâncias no interior da célula e assim impedir a ação antimicrobiana (GUL, et al., 2004).

A CBM seguiu a mesma tendência que a CMI, sendo necessárias maiores concentrações para as bactérias Gram-negativas. Os valores para CBM foram entre $2,00$ e $1,25 \text{ mg.mL}^{-1}$ para as bactérias Gram-negativas e entre $1,25$ e $1,00 \text{ mg.mL}^{-1}$ para as bactérias Gram-positivas. No geral a atividade antibacteriana dos extratos etanólicos da farinha de rizoma de cúrcuma e do hidrolisado de cúrcuma e pimenta-do-reino pode estar relacionada à presença da curcumina, da piperina e dos demais compostos fitoquímicos nos produtos em estudo.

Péret-Almeida et al. (2008) ao analisarem uma amostra comercial de farinha de rizoma de cúrcuma com 2,4 % de curcumina pelo método de difusão em ágar frente as bactérias *E. coli* e *S. aureus*, não observaram atividade antimicrobiana para extratos etanólicos da farinha do rizoma de cúrcuma, no entanto esta metodologia é limitada para moléculas hidrofóbicas, como a curcumina. Chakraborty et al. (2014) encontraram CMI e CBM de extratos etanólicos da farinha de rizoma de cúrcuma entre $10,67$ a $44,62 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$ frente às bactérias *K. pneumoniae*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *E. coli*, Méndez Álvarez, al. (2016) encontraram CMI de 1000 mg.mL^{-1} para inibição de 50 % das bactérias *K. pneumoniae* e *E. coli*.

As divergências encontradas no presente estudo, em relação às pesquisas acerca da atividade antimicrobiana publicadas anteriormente, podem ser explicadas pelas diferentes metodologias e ou pelas diferenças na composição química da planta. Esta pode ser influenciada por diferentes fatores tais como o ambiente, o local, as condições de cultivo e a época de colheita (DE BONA et al., 2014).

4. CONCLUSÃO

A produção de um hidrolisado a base de rizoma de cúrcuma e pimenta-do-reino por via enzimática atinge 100% de conversão de amido em

açúcares, quando há aplicação das enzimas α -amilase e amiloglucosidase nas etapas de hidrólise, nas seguintes condições: para liquefação temperatura igual a 95 °C, pH 6,03, 0,23 g de α -amilase 100 g⁻¹ de amido em 10 min; para a sacarificação as condições de temperatura 60 °C, pH 4,50, 1,60 mL de amiloglucosidase 100 g⁻¹ de amido em 8 h. O perfil dos açúcares obtidos desta hidrólise eram 97,43% de glicose e 2,31% de maltose.

Diferentes solventes influenciam a extração de compostos polifenólicos e a extração do teor de curcumina que estão presentes no rizoma de cúrcuma. A curcumina não é o único composto fitoquímico a influenciar na atividade antioxidante do rizoma de cúrcuma.

A conformação tautomérica da molécula de curcumina foi comprovada por espectro de FTIR como ceto-enólica. A presença de piperina no hidrolisado também pode ser observada no espectro.

A farinha do rizoma de cúrcuma e o hidrolisado de cúrcuma e pimenta-do-reino apresentam atividade antioxidante *in vitro* pelas metodologias de DPPH, ABTS e FRAP. Os mecanismos de ação antioxidante comprovados são transferência de átomos de hidrogênio, elétrons e estabilização de radical metálico.

Extratos etanólicos do rizoma de cúrcuma e do hidrolisado de cúrcuma e pimenta-do-reino apresentam atividade antimicrobiana para as bactérias patógenas *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella Enteritidis*, *Salmonella Typhi* e *Pseudomonas aeruginosa*.

5. REFERÊNCIAS

- AKINOLA, Alafiatayo A.; AHMAD, Syahida; MAZIAH, Mahmood. Total anti-oxidant capacity, flavonoid, phenolic acid and polyphenol content in ten selected species of Zingiberaceae rhizomes, **African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines**, v, 11, n, 3, p, 7-13, 2014.
- AMERICAN ASSOCIATION OF CEREAL CHEMISTS. **Approved Methods of the American Association of Cereal Chemists**, Amer Assn of Cereal Chemists, 2000.
- ANDRIĆ, Pavle et al. Effect and modeling of glucose inhibition and in situ glucose removal during enzymatic hydrolysis of pretreated wheat straw. **Applied biochemistry and biotechnology**, v, 160, n, 1, p, 280, 2010.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of the Association of Official Analytical Chemists**, Washington, 2012.
- BENZIE, Iris FF; STRAIN, J, J,. Ferric reducing/antioxidant power assay: Direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration, **Methods in enzymology**, v, 299, p, 15-27, 1999.
- BRAND-WILLIAMS, W,; CUVELIER, M, E,; BERSET, C, Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity, **Food Science and Technology**, London, v, 28, n, 1, p, 25-30, July, 1995.
- BURKERT, J, F, D, M,, MALDONADO, R, R,, ; RODRIGUES, M, I, Comparison of lipase production by *Geotrichum candidum* in stirring and airlift fermenters, **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v, 80, n, 1, p, 61-67, 2005.
- CASAGRANDE, R, et al. In vitro evaluation of quercetin cutaneous absorption from topical formulations and its functional stability by antioxidant activity, **International journal of pharmaceutics**, v, 328, n, 2, p, 183-190, 2007.
- CHAKRABORTY, B, et al. Bactericidal activity of selected medicinal plants against multidrug resistant bacterial strains from clinical isolates, **Asian Pacific journal of tropical medicine**, v, 7, p, S435-S441, 2014.
- CHIRANGINI, P,; SHARMA, G, J,; SINHA, S, K, Sulfur free radical reactivity with curcumin as reference for evaluating antioxidant properties of medicinal Zingiberales, **Journal of environmental pathology, toxicology and oncology**, v, 23, n, 3, 2004.
- COPELAND, Les et al. Form and functionality of starch, **Food hydrocolloids**, v, 23, n, 6, p, 1527-1534, 2009.
- DE BONA, E, et al. Comparação de métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração inibitória mínima (cim) de extratos vegetais aquosos e etanólicos, **Arquivos do Instituto Biológico**, v, 81, n, 3, p, 218-225, 2014.

DUBOIS, M.; GILLES, K,A.; HAMILTON, J,K.; REBERS, P,A.; SMITH, F, Colorimetric method for determination of sugar and related compounds, **Analytical Chemistry**, v,28, n, 3, p,350-356, 1956.

DUDONNÉ, S, et al. Comparative study of antioxidant properties and total phenolic content of 30 plant extracts of industrial interest using DPPH, ABTS, FRAP, SOD, and ORAC assays, **Journal of agricultural and food chemistry**, v, 57, n, 5, p, 1768-1774, 2009.

ESATBEYOGLU, T, et al. Curcumin—from molecule to biological function, **Angewandte Chemie International Edition**, v, 51, n, 22, p, 5308-5332, 2012.

FLOEGEL, A, et al. Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods, **Journal of food composition and analysis**, v, 24, n, 7, p, 1043-1048, 2011.

GANGWAR, R, K, et al. Curcumin conjugated silica nanoparticles for improving bioavailability and its anticancer applications, **Journal of agricultural and food chemistry**, v, 61, n, 40, p, 9632-9637, 2013, GOEL, A,, KUNNUMAKKARA, A, B,, ; AGGARWAL, B, B, (2008), Curcumin as “Curecumin”: from kitchen to clinic, **Biochemical pharmacology**, 75(4), 787-809.

GORINSTEIN, Shela et al. Some analytical assays for the determination of bioactivity of exotic fruits, **Phytochemical Analysis**, v, 21, n, 4, p, 355-362, 2010.

GUL, MUJAHID, T, Y,, JEHAN, N,, ; AHMAD, S, Studies on the antibacterial effect of different fractions of *Curcuma longa* against urinary tract infection isolates, **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v, 7, n, 12, p, 2055-2060, 2004.

GUPTA, Ankur; MAHAJAN, Surabhi; SHARMA, Rajendra, Evaluation of antimicrobial activity of *Curcuma longa* rhizome extract against *Staphylococcus aureus*, **Biotechnology reports**, v, 6, p, 51-55, 2015.

HMAR, Baby Z.; KALITA, Dipsikha; SRIVASTAVA, Brijesh, Optimization of microwave power and curing time of turmeric rhizome (*Curcuma Longa L.*) based on textural degradation, **LWT-Food Science and Technology**, v, 76, p, 48-56, 2017.

HUANG, Xiaoxia et al. Enhancement of curcumin water dispersibility and antioxidant activity using core–shell protein–polysaccharide nanoparticles, **Food Research International**, v, 87, p, 1-9, 2016.

JHA, N, S,, MISHRA, S,, JHA, S, K,, ; SUROLIA, A Antioxidant activity and electrochemical elucidation of the enigmatic redox behavior of curcumin and its structurally modified analogues, **Electrochimica Acta**, v, 151, p, 574-583, 2015.

JOVANOVIC, Slobodan V, et al. H-atom transfer is a preferred antioxidant mechanism of curcumin, **Journal of the American Chemical Society**, v, 121, n, 41, p, 9677-9681, 1999.

JYOTHI, A, N,; MOORTHY, S, N,; VIMALA, B, Physicochemical and functional properties of starch from two species of Curcuma, **International Journal of Food Properties**, v, 6, n, 1, p, 135-145, 2003.

KASOTE, D, M,, KATYARE, S, S,, HEGDE, M, V,, ; BAE, H, Significance of antioxidant potential of plants and its relevance to therapeutic applications, **International journal of biological sciences**, v, 11, n, 8, p, 982, 2015.

KOLEV, T, M,, VELCHEVA, E, A,, STAMBOLIYSKA, B, A,, ; SPITELLER, M, DFT and experimental studies of the structure and vibrational spectra of curcumin, **International Journal of Quantum Chemistry**, v, 102, n, 6, p, 1069-1079, 2005.

KOLUSHEVA, T,; MARINOVA, A, A study of the optimal conditions for starch hydrolysis through thermostable α -amylase, **Journal of the University of Chemical Technology and Metallurgy**, v, 42, n, 1, p, 93-96, 2007.

KUMAR, Dinesh et al. Enhanced bioavailability and relative distribution of free (unconjugated) curcuminoids following the oral administration of a food-grade formulation with fenugreek dietary fibre: A randomised double-blind crossover study, **Journal of Functional Foods**, v, 22, p, 578-587, 2016.

LEONEL, M,; SARMENTO, SBS; CEREDA, M, P,, New starches for the food industry: *Curcuma longa* and *Curcuma zedoaria*, **Carbohydrate Polymers**, Oxford: Elsevier B,V,, v, 54, n, 3, p, 385-388, 2003.

LEONEL, Magali; CEREDA, Marney Pascoli, Avaliação da celulase e pectinase como enzimas complementares, no processo de hidrólise-sacarificação do farelo de mandioca para produção de etanol, **Ciênc, Tecnol, Aliment**, v, 19, n, 1, p, 113-117, 1999.

LI, Qiuping et al. Curcumin–piperine mixtures in self-microemulsifying drug delivery system for ulcerative colitis therapy, **International journal of pharmaceutics**, v, 490, n, 1, p, 22-31, 2015.

LONG, Y,, ZHANG, W,, WANG, F,, ; CHEN, Z,, Simultaneous determination of three curcuminoids in *Curcuma longa* L, by high performance liquid chromatography coupled with electrochemical detection, **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v, 4, n, 5, p, 325-330, 2014.

LÓPEZ-ALARCÓN, Camilo; DENICOLA, Ana, Evaluating the antioxidant capacity of natural products: A review on chemical and cellular-based assays, **Analytica chimica acta**, v, 763, p, 1-10, 2013.

MANGOLIM, Camila Sampaio et al. Curcumin– β -cyclodextrin inclusion complex: stability, solubility, characterisation by FT-IR, FT-Raman, X-ray diffraction and photoacoustic spectroscopy, and food application, **Food chemistry**, v, 153, p, 361-370, 2014.

MANIGLIA, B, C,, DE PAULA, R, L,, DOMINGOS, J, R,, TAPIA-BLÁCIDO, D, R, Turmeric dye extraction residue for use in bioactive film production: Optimization

of turmeric film plasticized with glycerol, **LWT-Food Science and Technology**, v, 64, n, 2, p, 1187-1195, 2015.

MANIGLIA, B, C,, DOMINGOS, J, R,, DE PAULA, R, L,, ; TAPIA-BLÁCIDO, D, R, Development of bioactive edible film from turmeric dye solvent extraction residue, **LWT-Food Science and Technology**, v, 56, n, 2, p, 269-277, 2014.

MANOLOVA, Y,, DENEVA, V,, ANTONOV, L,, DRAKALSKA, E,, MOMEKOVA, D,, ; LAMBOV, N,, The effect of the water on the curcumin tautomerism: A quantitative approach, **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v, 132, p, 815-820, 2014.

MÉNDEZ ÁLVAREZ, Nelson; ANGULO ORTÍZ, Alberto; CONTRERAS MARTÍNEZ, Orfa, Actividad antibacteriana in vitro de *Curcuma longa* (Zingiberaceae) frente a bacterias nosocomiales en Montería, Colombia, **Revista de Biología Tropical**, v, 64, n, 3, p, 1201-1208, 2016.

MOHAN, P, K,, SREELAKSHMI, G,, MURALEEDHARAN, C, V,, ; JOSEPH, R, Water soluble complexes of curcumin with cyclodextrins: Characterization by FT-Raman spectroscopy, **Vibrational Spectroscopy**, v, 62, p, 77-84, 2012.

MOORTHI, C,; KATHIRESAN, K, Curcumin–Piperine/Curcumin–Quercetin/Curcumin–Silibinin dual drug-loaded nanoparticulate combination therapy: A novel approach to target and treat multidrug-resistant cancers, **Journal of Medical Hypotheses and Ideas**, v, 7, n, 1, p, 15-20, 2013.

MORAES, J,, BRANZANI, R, S,, ; FRANCO, C, M, (2014), Behavior of Peruvian carrot (*Arracacia xanthorrhiza*) and cassava (*Manihot esculenta*) starches subjected to heat-moisture treatment, **Starch-Stärke**, v, 66, n, 7-8, p, 645-654, 2014.

NELSON, N, A fotometric adaptaion of Somogyi method for the determination of glucose, **J,Biol,Chen**, , v, 153, p, 375-80, 1944.

NOVOZYMES®, Disponível em: <<http://www.novozymes.com>>, Acesso em: 30 de março de 2015.

PARK, Daewon et al. Immobilization of starch-converting enzymes on surface-modified carriers using single and co-immobilized systems: properties and application to starch hydrolysis, **Process Biochemistry**, v, 40, n, 1, p, 53-61, 2005.

PÉRET-ALMEIDA, Lúcia et al. Atividade antimicrobiana in vitro do rizoma em pó, dos pigmentos curcuminóides e dos óleos e dos essenciais da *Curcuma longa* L, **Ciência e Agrotecnologia**, 2008.

PRASAD, S,, GUPTA, S, C,, TYAGI, A, K,, ; AGGARWAL, B, B,, Curcumin, a component of golden spice: from bedside to bench and back, **Biotechnology advances**, v, 32, n, 6, p, 1053-1064, 2014.

PRICE, Lisa C,; BUESCHER, R, W, Kinetics of alkaline degradation of the food pigments curcumin and curcuminoids, **Journal of food science**, v, 62, n, 2, p, 267-269, 1997.

PRIYADARSINI, K, Indira, Photophysics, photochemistry and photobiology of curcumin: Studies from organic solutions, bio-mimetics and living cells, **Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews**, v, 10, n, 2, p, 81-95, 2009.

RE, R,, PELLEGRINI, N,, PROTEGGENTE, A,, PANNALA, A,, YANG, M,, RICE-EVANS, C,, Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay, **Free radical biology and medicine**, v, 26, n, 9, p, 1231-1237, 1999.

SAHNE, F,, MOHAMMADI, M,, NAJAFPOUR, G, D,, ; MOGHADAMNIA, A, A, (2017), Enzyme-assisted ionic liquid extraction of bioactive compound from turmeric (*Curcuma longa* L.): Isolation, purification and analysis of curcumin, **Industrial Crops and Products**, 95, 686-694.

SAHNE, F,, MOHAMMADI, M,, NAJAFPOUR, G, D,, ; MOGHADAMNIA, A, A, Enzyme-assisted ionic liquid extraction of bioactive compound from turmeric (*Curcuma longa* L.): Isolation, purification and analysis of curcumin, **Industrial Crops and Products**, v, 95, p, 686-694, 2017.

SÁNCHEZ-GONZÁLEZ, I, et al. In vitro antioxidant activity of brewed using different procedures: Italian, espresso and filter, **Food Chemistry**, Oxford, v, 90, n, 1/2, p, 133-139, Jan./Feb, 2005.

SARI, T, P,, MANN, B,, KUMAR, R,, SINGH, R, R, B,, SHARMA, R,, BHARDWAJ, M,, ; ATHIRA, S,, Preparation and characterization of nanoemulsion encapsulating curcumin, **Food Hydrocolloids**, v, 43, p, 540-546, 2015.

SHAHIDI, Fereidoon; AMBIGAIPALAN, Priyatharini, Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects—A review, **Journal of functional foods**, v, 18, p, 820-897, 2015.

SHOBA, Guido et al. Influence of piperine on the pharmacokinetics of curcumin in animals and human volunteers, **Planta medica**, v, 64, n, 04, p, 353-356, 1998.

SILVA, R, D, N,, QUINTINO, F, P,, MONTEIRO, V, N,, ; ASQUIERI, E, R,, Production of glucose and fructose syrups from cassava (*Manihot esculenta* Crantz) starch using enzymes produced by microorganisms isolated from Brazilian Cerrado soil, **Food Science and Technology (Campinas)**, v, 30, n, 1, p, 213-217, 2010.

SINGLETON, V, L,; ORTHOFER, R,; LAMUELA-RAVENTOS, R, M, Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocateau reagent, **Methods in Enzymology**, New York, v, 299, p, 152-178, 1999.

SOMOGY, M, A New Reagent for Determination of Sugars, **A new Sugar Reagent**, May p, 61 — 68, 1945.

SPINOSA, W, A,, DOS SANTOS JÚNIOR, V,, GALVAN, D,, FIORIO, J, L,, ; GOMEZ, R, J, H, C, Fermentation Kinetics of Rice Syrup, with High Content of Dextrose Equivalent, by *Saccharomyces cerevisiae* and Characterization of Volatile Compounds from Wine, **Journal of Food Processing and Preservation**, 2016.

SUETH-SANTIAGO, V, et al. Curcumina, o pó dourado do açafão-da-terra: introspecções sobre química e atividades biológicas, **Química Nova**, v, 38, n, 4, p, 538-552, 2015.

SURESH, D,; SRINIVASAN, K, Tissue distribution ; elimination of capsaicin, piperine ; curcumin following oral intake in rats, **Indian J, Med, Res**, 131, 682– 691, 2010.

TORRES, L, M,; LEONEL, M, ; MISCHAN M, M, (2012), Concentração de enzimas amilolíticas na hidrólise do amido de gengibre, **Ciência Rural**, v, 42, n, 7, 2012.

VIGNOLI, Josiane Alessandra; BASSOLI, Denisley Gentil; DE TOLEDO BENASSI, Marta, Atividade antioxidante de cafés torrado e solúvel: padronização e validação de métodos, **Coffee Science**, v, 7, n, 1, p, 68-75, 2012.

WANG, J,, WANG, H,, ZHU, R,, LIU, Q,, FEI, J,, ; WANG, S,, Anti-inflammatory activity of curcumin-loaded solid lipid nanoparticles in IL-1 β transgenic mice subjected to the lipopolysaccharide-induced sepsis, **Biomaterials**, v, 53, p, 475-483, 2015.

WANG, Y, J,, PAN, M, H,, CHENG, A, L,, LIN, L, I,, HO, Y, S,, HSIEH, C, Y,, ; LIN, J, K, Stability of curcumin in buffer solutions and characterization of its degradation products, **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v, 15, n, 12, p, 1867-1876, 1997.

WICHITNITHAD, W,, JONGAROONNGAMSANG, N,, PUMMANGURA, S,, ; ROJSITTHISAK, P,, A simple isocratic HPLC method for the simultaneous determination of curcuminoids in commercial turmeric extracts, **Phytochemical Analysis**, v, 20, n, 4, p, 314-319, 2009.

ZARAI, Z,, BOUJELBENE, E,, SALEM, N, B,, GARGOURI, Y,, ; SAYARI, A, Antioxidant and antimicrobial activities of various solvent extracts, piperine and piperic acid from *Piper nigrum*, **LWT-Food Science and Technology**, v, 50, n, 2, p, 634-641, 2013.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Um hidrolisado com alto teor de glicose produzido a partir de cúrcuma e pimenta-do-reino foi obtido e sua ação antioxidante e antimicrobiana foi comprovada em determinações *in vitro*. Os próximos passos serão a caracterização do produto obtido quanto ao perfil de açúcares, Brix, pH e acidez para avaliação de sua aplicação como fonte de açúcares para aplicação em processos fermentativos. Testes *in vivo* para comprovar a atividade antioxidante e o aumento da biodisponibilidade da molécula de curcumina pela presença da piperina no hidrolisado também deverá ser realizado. Em estudos futuros, a determinação do perfil de compostos polifenólicos presente na cúrcuma e no hidrolisado de cúrcuma e pimenta-do-reino permitirá correlacionar o teor de curcumina e teor de polifenólicos totais à ação antioxidante.