

# Biossíntese Dirigida pelo Precursor de Curcumina pela *Curcuma longa* L.

## Precursor-Directed Biosynthesis of Curcumin by *Curcuma longa* L.

Ednilza Moraes de Lima<sup>a</sup>; Gabriel Antônio<sup>a</sup>; Khaled Hayek<sup>b</sup>; Carolina Passarelli Gonçalves<sup>\*c</sup>; José Jardes da Gama Bitencourt<sup>d</sup>

<sup>a</sup>Universidade Anhanguera de São Paulo. SP, Brasil.

<sup>b</sup>Universidade Anhanguera de São Paulo, Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Biotecnologia e Inovação em Saúde. SP, Brasil.

<sup>c</sup>Universidade Anhanguera de São Paulo, Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Farmácia. SP, Brasil.

<sup>d</sup>Centro Universitário FIEO. SP, Brasil.

\*E-mail: [carolina.goncalves@kroton.com.br](mailto:carolina.goncalves@kroton.com.br)

### Resumo

O composto (*E,E*)-1,7-bis(4-hidroxi-3-metoxifenil)-1,6-heptadieno-3,5-diona, conhecido popularmente como curcumina, é um composto fitoquímico encontrado nos rizomas da *Curcuma longa* L. Esta substância já demonstrou diversas atividades terapêuticas importantes, como anti-inflamatória, antioxidante, antibacteriana, antiviral e antitumoral, por exemplo. Entretanto, apesar de ser o composto majoritário da via biossintética da *Curcuma longa* L. é descrito que apenas de 2 a 8% do peso total do rizoma, corresponde à quantidade de curcumina que pode ser extraída. Com o objetivo de estimular a biossíntese da curcumina, este trabalho utilizou a biossíntese dirigida por precursores, que combina síntese química com transformações enzimáticas naturais, e permite que materiais de partida não nativos sejam incorporados às vias biossintéticas. Utilizando essa abordagem foi estabelecido um sistema *in vitro* de cultura do rizoma suplementado com o precursor, ácido ferúlico e dois análogos. Os dois análogos sintetizados são sais de potássio solúveis em água e foram obtidos com alto grau de pureza e rendimentos consideráveis. A incorporação de diferentes concentrações do precursor e seus análogos ocasionou, em algumas concentrações, um aumento de até 40% da biossíntese da curcumina. O método desenvolvido, validado, utiliza a espectroscopia UV/VIS para quantificar as concentrações de curcumina, através da análise de seus extratos alcoólicos, nos extratos obtidos a partir dos rizomas suplementados.

**Palavras-chave:** Curcumina. Rizoma. Biossíntese Dirigida pelo Precursor. Ácido Ferúlico. Sais Potássicos.

### Abstract

The compound (*E,E*)-1,7-bis(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-1,6-heptadiene-3,5-dione, popularly known as curcumin, is a phytochemical found in the rhizomes of *Curcuma longa* L. This substance has already demonstrated several important therapeutic activities, such as anti-inflammatory, antioxidant, antibacterial, antiviral and antitumor, for example. However, despite being the major compound of the *Curcuma longa* L. biosynthetic pathway, it is described that only from 2 to 8% of the total weight of the rhizome corresponds to the amount of curcumin that can be extracted. In order to stimulate the curcumin biosynthesis, this work used the precursor-directed biosynthesis, which combines chemical synthesis with natural enzymatic transformations, and allows that non-native starting materials to be incorporated into the biosynthetic pathways. Using this approach, an *in vitro* rhizome culture system supplemented with the precursor, ferulic acid and two analogs was established. The two synthesized analogs are water-soluble potassium salts and were obtained with a high degree of purity and considerable yields. The incorporation of different precursor concentrations and its analogues caused, in some concentrations, an increase of up to 40% in curcumin biosynthesis. The method was developed, validated, and uses UV/VIS spectroscopy to quantify curcumin concentrations, through the analysis of its alcoholic extracts, in extracts obtained from supplemented rhizomes.

**Keywords:** Curcumin. Rhizome. Precursor-Directed Biosynthesis. Ferulic Acid. Potassium Salts.

### 1 Introdução

Os compostos naturais são fonte de inspiração para o desenvolvimento da maioria dos medicamentos. Mais de 35% dos fármacos disponíveis hoje na terapêutica são inspirados em compostos naturais (CALIXTO, 2019). Um dos compostos naturais com atividade farmacológica relevante é o (*E,E*)-1,7-bis(4-hidroxi-3-metoxifenil)-1,6-heptadieno-3,5-diona ou curcumina como é mais conhecido, o qual é encontrado majoritariamente no rizoma da planta *Curcuma longa* L. (NELSON et al., 2017).

A curcumina é utilizada na medicina Ayurvédica há mais de 6000 anos e tem demonstrado efetividade para o tratamento de doenças hepáticas e sinusite (LEE et al., 2013), assim como propriedades anti-inflamatória (FADUS et al., 2017),

antioxidante (HUSSAIN et al., 2017), antiparasitária (RAI et al., 2020), antiviral (MATHEW; HSU, 2018) e antitumoral (YAKUB et al., 2020). Entretanto, é descrito que, apenas 2% do peso do rizoma da *Curcuma longa* L. corresponde à quantidade total de curcumina (SUETH-SANTIAGO et al., 2015). Além da baixa concentração de curcumina disponível, a presença de diversos componentes fitoquímicos dificulta a utilização desta substância com um grau de pureza adequado, podendo tornar sua utilização, muitas vezes inviável por questões econômicas e limitar os estudos farmacológicos.

É importante ressaltar que a rota sintética para obtenção da substância pura em laboratório, também não foi apreciável, pela dificuldade de obtenção deste composto, resultando em rendimentos finais baixos (ATANASOV et al., 2015).

Por se tratar de uma substância de alto potencial bioativo, trabalhos conduzidos anteriormente revelaram a via biossintética natural desta substância. Os precursores para biossíntese de curcumina foram descritos, pela primeira vez, por Roughley e Whiting (1973). No estudo foram utilizados precursores marcados com deutério e carbono-14. Esse estudo permitiu aos autores concluir, que havia a união de dois fragmentos de ácido ferúlico a um carbono central, originando o padrão estrutural denominado diferuloilmetano. O estudo também demonstrou que o ácido ferúlico é o melhor precursor, pois foi significativamente incorporado a curcumina, quando comparado ao ácido 4-cumárico e o ácido cafeico.

Mais tarde, Kita et al. (2008) utilizaram diversos precursores metabólicos, marcados com carbono-13, e propuseram que a via preferencial consiste na biossíntese do intermediário-chave dicinamoilmetano e as substituições dos anéis aromáticos acontecem posteriormente. Dessa forma, pode-se concluir que os curcuminoides 7 e 8 são intermediários biossintéticos da curcumina 9, e não produtos finais de uma via biossintética alternativa. Na biossíntese descrita por Kita, também foi demonstrado a formação de curcumina, a partir do ácido ferúlico na presença de ácido malônico.

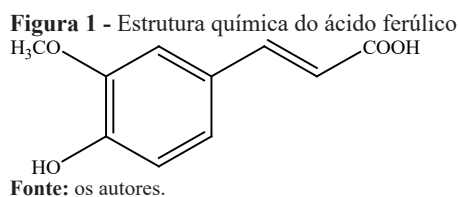
Tendo em vista a baixa concentração de curcumina, no rizoma da *Curcuma longa L.*, o presente trabalho traz uma estratégia de biossíntese dirigida pelo precursor (BDP), a partir da suplementação exógena do precursor ácido ferúlico (A) e dois derivados salinos potássicos, o ferulato de potássio (B) e o diferulato de Potássio (C). A BDP é um método poderoso para introduzir materiais de partida naturais, ou não em vias biossintéticas, para a obtenção de metabólito secundários em meios de cultivo *in vitro* de um organismo produtor. Assim, organismos capazes de incorporar esses precursores, em seus processos, fornecem maior quantidade do metabolito seguinte, da via biossintética (SUETH-SANTIAGO et al., 2015).

## 2 Material e Métodos

Todos os solventes utilizados foram destilados antes do uso. Para monitorar as reações foi utilizada cromatografia em camada delgada (CCD) de 0,2 mm (254 F) da Merk. Para detecção, a CCD foi irradiada com luz UV ( $\lambda$  254 nm). Os reagentes utilizados foram da Fluka. O padrão de curcumina utilizado foi o Sigma-Aldrich, com 98% de pureza. O equipamento utilizado para as análises foi uma balança analítica (QUIMIS Q-500 L210C) e um espectrofotômetro Hitachi UV/VIS modelo U2010.

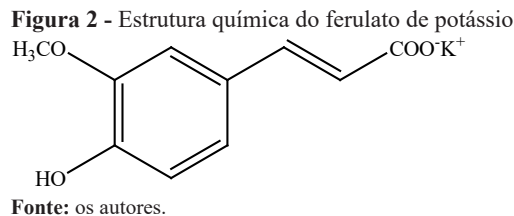
### 2.1 Síntese Orgânica

#### 2.1.1 Ácido Ferúlico (A)



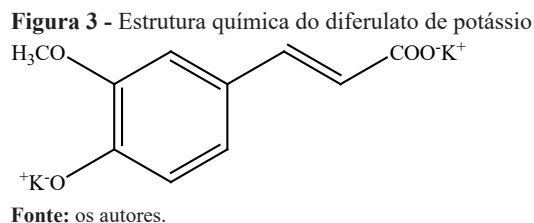
Uma mistura de vanilina (0,456 g, 3 mmol), ácido malônico (0,4 mL, 6 mmol), piridina (1,0 mL) e piperidina (0,01 mL) foi irradiada por 30 minutos em banho de ultrassom a temperatura ambiente. Após este período, o excesso de piridina foi neutralizado pela adição de ácido clorídrico concentrado. O precipitado foi filtrado e lavado com água destilada. O produto foi recristalizado com etanol. Fórmula:  $C_{10}H_{10}O_4$ . Massa molecular: 194 g/mol. Rendimento: 71%.  $^1H$  RMN:  $\delta$  11,23 (1H, s, COOH), 7,64 (1H, d, J = 15,9 Hz, 3-H), 7,36-6,85 (3H, m, Ar-H), 6,23 (1H, d, J = 15,9 Hz, 2-H), 4,72 (1H, OH), 3,86 (3H, s, OCH<sub>3</sub>).

#### 2.1.2 Ferulato de Potássio (B)



Uma solução de (1,94 g, 10 mmol) de ácido ferúlico e etanol absoluto (50 mL) foi irradiada até se obter uma solução homogênea. Em seguida (0,66 g, 10 mmol) de uma solução metanólica de KOH a 85% foi adicionado gota a gota. A mistura de reação foi mantida sob irradiação ultrassônica constante a 40°C até a formação de um sal insolúvel e cristalino. O produto foi filtrado e lavado com hexano (2x50 mL). Fórmula:  $C_{10}H_9O_4K$ . Massa molecular: 232 g/mol. Rendimento: 89%.

#### 2.1.3 Diferulato de Potássio (C)



Uma solução de (1,94 g, 10 mmol) de ácido ferúlico e etanol absoluto (50 mL) foi irradiada até se obter uma solução homogênea. Em seguida (1,32g, 10 mmol) de uma solução metanólica de KOH a 85% foi adicionado gota a gota. A mistura de reação foi mantida sob irradiação ultrassônica constante a 40 °C até a formação de um sal insolúvel e cristalino. O produto foi filtrado e lavado com hexano (2x50 mL). Fórmula:  $C_{10}H_8K_2O_4$ . Massa molecular: 270 g/mol. Rendimento: 93%.

### 2.2 Cultivo *in vitro* do rizoma

O meio de cultura sólido Murashige e Skoog (MS) esterilizado (pH 5,8), contendo ágar a 0,9% e sacarose a 3%, foi suplementado com ácido ferúlico, ferulato de potássio e diferulato de potássio diferenciado nas concentrações de 2,5mg/mL, 5mg/mL, 7,5mg/mL e 10 mg/mL. Os rizomas

foram esterilizados com álcool na concentração de 70% e radiação ultravioleta, por 15 minutos. Após a esterilização, os rizomas foram inoculados assepticamente em 50mL de MS e mantidos por períodos de 16 horas no claro e 8 horas no escuro.

### 2.3 Obtenção dos extratos

Após 12 semanas, os rizomas foram removidos do meio MS e higienizados. A extração continuada realizada por Soxhlet, com 1g de rizoma e 150 mL de etanol. O sistema foi mantido em refluxo por 72 horas. Após este período, o solvente foi destilado.

### 2.4 Análise dos dados

A absorbância (ABS) de soluções padrão de curcumina em etanol, de 50µg/mL a 5µg/mL variando 5 µg/mL, foi medida a 425 nm. A curva de calibração padrão foi preparada plotando a absorbância máxima média ( $\lambda$  max) versus concentração. A linearidade foi estudada usando uma equação de regressão.

### 2.5 Linearidade

A análise de regressão foi realizada para obter o intervalo de linearidade.

### 2.6 Precisão

No método de análise padrão, dez concentrações diferentes de curcumina padrão em etanol foram preparadas a partir de soluções estoque, e seu ABS foi medido para a construção da curva padrão. O método foi repetido três vezes para cada concentração.

### 2.7 Reprodutibilidade

O método de reprodutibilidade foi realizado analisando a curcumina padrão em etanol em um único dia. A precisão intermediária foi realizada analisando as mesmas concentrações em três dias diferentes.

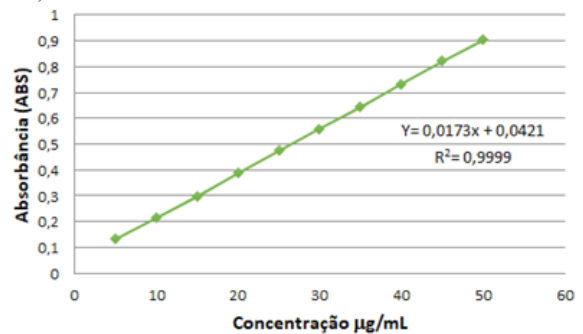
## 2.8 Preparação de amostras para análise

Após a obtenção dos extratos concentrados, foram obtidas soluções etanólicas de estoque de todas as amostras na concentração de 1mg/mL. Após diluições seriadas de todas as amostras, diferentes concentrações foram obtidas (5-50µg/mL). A quantificação do conteúdo de curcumina nos extratos foi realizada a partir da diluição de 30 µg/mL e com o auxílio da curva padrão.

## 3 Resultados e Discussão

O método espectroscópico UV-VIS proposto foi considerado específico e seletivo para quantificação de curcumina nos extratos. O solvente utilizado como branco foi o etanol e o comprimento de onda de absorção máximo ( $\lambda$  max) da curcumina utilizada foi de 425 nm, conforme recomendado por ANVISA (ANVISA, 2015).

**Figure 4** - Gráfico de correlações linear de absorbância e concentração de curcumina padrão, com coeficiente de correlação de 0,999



Fonte: dados da pesquisa.

O Quadro 1 mostra os valores de absorbância a 425 nm obtidos, na concentração de 30 µg/mL em etanol, para todas as amostras cultivadas e coletadas. A concentração de curcumina para cada amostra foi demonstrada pelo cálculo de tendência. A análise foi realizada em triplicada.

**Quadro 1** - Resultados obtidos na análise dos extratos relativos à absorbância e concentração de curcumina nos rizomas cultivados e coletados

Quantificação do Conteúdo de Curcumina nas Amostras Suplementadas (30 µg/mL)				
Suplemento	Identificação da amostra	Concentração de suplementação (g/mL)	ABS (=425nm)	Concentração de curcumina calculada (g/mL)
Controle*	1	---	0.374	19.23
Ácido Ferúlico (A)	2	2.5	0.294	14.60
	3	5.0	0.477	25.20
	4	7.5	0.455	23.93
	5	10.0	0.271	13.27
	6	2.5	0.384	19.81
Ferulato de Potássio (B)	7	5.0	0.509	27.05
	8	7.5	0.325	16.39
	9	10.0	0.283	13.96
Diferulato de potássio (C)	10	2.5	0.399	20.68
	11	5.0	0.459	24.16
	12	7.5	0.423	22.07
	13	10.0	0.148	6.14

\* Amostra controle. O rizoma foi cultivado de acordo com a metodologia descrita, porém sem nenhum tipo de suplementação.

Fonte: dados da pesquisa.

Os resultados mostram que, com exceção das amostras 2, 5, 8, 9 e 13, todas apresentaram maior concentração de curcumina, em comparação com o padrão, a amostra 1, que foi cultivada sem suplementação. As amostras com maior concentração de curcumina 3, 7 e 11 foram suplementadas com 5 g/mL dos derivados sintéticos. A porcentagem de variação entre as concentrações mais altas obtidas foi calculada por referência ao valor da concentração obtido pelo extrato de curcumina padrão.

**Quadro 2** - Coeficiente de variação entre as maiores concentrações de curcumina obtidas

Amostra	Concentração de curcumina calculada (g/mL)	Coeficiente de variação (%)
3	25.20	31.02666
7	27.05	40.66601
11	24.16	24.70186

Fonte: dados da pesquisa.

Os resultados do coeficiente de variação mostraram que houve um aumento de mais de 40% na concentração de curcumina, no rizoma suplementado com o composto B. As amostras 5, 9 e 13 suplementadas com 10 mg/mL de ácido ferúlico, ferulado de potássio e diferulato de potássio, respectivamente, apresentaram menores concentrações de curcumina, o que indica que o aumento da biossíntese natural da curcumina não está associado à concentração do suplemento.

#### 4 Conclusão

Houve aumento considerável na biossíntese natural de curcumina, especialmente, os rizomas suplementados na concentração de 5 mg/mL do precursor ácido ferúlico e seus sais potássicos análogos. Com base nos resultados, os parâmetros demonstram que esse método pode ser específico e notável pela análise da curcumina nos extratos de açafrão.

#### Agradecimentos

A Fundação Nacional de Desenvolvimento do Ensino Superior Particular - Funadesp pelo auxílio financeiro para o desenvolvimento deste projeto (Processo 2018-0003-R183). A Universidade Anhanguera de São Paulo, por viabilizar o desenvolvimento do projeto.

#### Referências

- ANVISA *onografia da espécie Curcuma longa L. (Curcuma)*. Disponível em: <<https://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2016/fevereiro/22/Monografia-Curcuma-CP-corrigida.pdf>>. Acesso em: 25 jul. 2020.
- ATANASOV, A. G. *et al.* Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: a review. *Biotechnol Adv.*, v.33, n.8, p.1582–1614, 2015. doi: 10.1016/j.biotechadv.2015.08.001.
- ALIXTO, J. B. The role of natural products in modern drug discovery. *Anais Acad. Bras. Ciênc.*, v.91, 2019. doi: 10.1590/0001-3765201920190105.
- FADUS, M. C. *et al.* Curcumin: an age-old anti-inflammatory and anti-neoplastic agent. *J. Trad. Complem. Med.*, v.7, n.3, p.339-346, 2017. doi: 10.1016/j.jtcm.2016.08.002.
- HUSSAIN, Z. *et al.* Exploring recent developments to improve antioxidant, anti-inflammatory and antimicrobial efficacy of curcumin: a review of new trends and future perspectives. *Mat. Sci. Engineering. C, Mat. Biol. Applic.*, v.77, p.1316-1326, 2017. doi: 10.1016/j.msec.2017.03.226.
- KITA, T. *et al.* The Biosynthetic Pathway of Curcuminoid in Turmeric (*Curcuma longa*) as Revealed by <sup>13</sup>C-Labeled Precursors. *Biosc. Biotechnol. Biochem.*, v.72, n.7, p.1789-1798, 2008. doi: 10.1271/bbb.80075.
- MATHEW, D.; HSU, W.-L. Antiviral potential of curcumin. *J. Funct. Foods*, v.40, p.692-699, 2018. doi: 10.1016/j.jff.2017.12.017.
- NELSON, K.M. *et al.* The essential medicinal chemistry of Curcumin. *J. Med. Chem.*, v.60, n.5, p. 1620-1637, 2017. doi: 10.1021/acs.jmedchem.6b00975.
- RAI, M. *et al.* Curcumin and curcumin-loaded nanoparticles: antipathogenic and antiparasitic activities. *Expert Rev. Anti-Infect. Ther.*, v.18, n.4, p.367-379, 2020. doi: 10.1080/14787210.2020.1730815.
- ROUGHLEY, P.J.; WHITING, D.A. Experiments in the biosynthesis of curcumin. *J. Chem. Soc. {,} Perkin Trans. 1*, n. 0, p. 2379–2388, 1973. doi: 10.1039/P19730002379.
- SUETH-SANTIAGO, V. *et al.* Curcumina, o pó dourado do açafrão da terra: introspecções sobre química e atividades biológicas. *Quim. Nova*, v.38, p.538-552, 2015. doi: 10.5935/0100-4042.20150035.
- YAKUB, G. *et al.* Curcumin-PVP Loaded electrospun membranes with conferred antibacterial and antitumoral activities. *Fibers Polymers*, v.21, n.1, p.55-65, 2020. doi: 10.1007/s12221-020-9473-z.
- LEE, W.H. *et al.* Curcumin and its derivatives: their application in neuropharmacology and neuroscience in the 21st Century. *Curr Neuropharmacol.*, v.11, n.4, p.338-378, 2013. doi: 10.2174/1570159X11311040002.