

EFEITOS DA TINTURA DE CURCUMINA SOBRE O BIOENSAIO *Allium cepa* L.

Henrique R. Covali-Pontes^{1*}, Danielle S. de Lima²

1. Graduando do curso de Ciências Biológicas – Bacharelado,
Instituto de Biociências, UFMS.

2. Professora Associada, Instituto de Biociências, UFMS / Orientadora

Resumo

A *Curcuma longa*, popularmente conhecida como açafrão-da-terra, apresenta em maior abundâncias em seus rizomas a molécula Curcumina, que apresenta diversas atividades biológicas. Visto isso o presente trabalho avaliou os efeitos da Curcumina, sob a forma de tintura (diluição etanólica), sobre o ciclo celular e o material genético do bioensaio *Allium cepa*. Os parâmetros analisados foram toxicidade, citotoxicidade e genotoxicidade. Foram analisadas três concentrações da tintura de Curcumina, determinadas de acordo com sua posologia. Quanto aos parâmetros de toxicidade e genotoxicidade, não foram observadas alterações. No entanto, as concentrações 2 e 3 apresentaram efeitos significativos de citotoxicidade. Foi observado aumento no tamanho dos nucléolos em células de raízes expostas à concentração 2, o que também é um indicador de citotoxicidade. Com isso, é possível afirmar que a tintura de Curcumina apresenta, em determinadas concentrações, potencial citotóxico.

Palavras-chave: Teste de *Allium*; Citotoxicidade; *Curcuma longa*

Introdução

Curcumina é um composto de natureza fenólica encontrada, principalmente, nos rizomas de *Curcuma longa*, conhecida popularmente como Açafrão-da-terra, espécie vegetal da família da Zingiberaceae, nativa dos continentes americano, asiático e Oceania (Mathai, 1979). Em 1815 Vogel isolou a Curcumina a partir de turméricos (rizomas secos triturados). Mais tarde, em 1910, foi elucidada sua estrutura química por outros pesquisadores (Lampe et al., 1910). A partir de então, muitos trabalhos foram feitos tanto no campo químico, como também no biológico à procura de comprovação da sua atividade. Os turméricos apresentam uma composição química muito variada. Entretanto, a classe de composto mais abundante é a dos curcuminóides, dentre os quais se destaca a Curcumina (em maior quantidade) e seus intermediários (Goel et al., 2008). Tais compostos intermediários podem ser encontrados comercialmente junto a Curcumina.

Sua atividade biológica é muito variada devido à estrutura molecular que permite sua ação em vários alvos. Dentre suas características está sua capacidade antioxidante (Sugiyama et al., 1996). Trabalhos já foram realizados analisando sua atividade como antibiótico (Sousa, 2018) antimicrobiana (Péret-Almeida et al., 2008), antifúngica (Mendes, 2017), antiviral (Mounce et al., 2017), antitumoral (Matos, 2017), entre outros. Nos últimos anos, tal potencial medicinal da Curcumina tem chamado muita atenção da população, o que aumentou as formas da sua apresentação comercial: cápsulas, chás, pomadas, pó, tinturas, entre outros. Todavia, o consumo popular levanta questionamentos acerca de quão segura é sua utilização. A fim de contribuir na elucidação dos possíveis efeitos tóxicos, citotóxicos e genotóxicos da Curcumina, o presente trabalho avaliou a atividade da sua tintura, comercializada com fins medicinais, sobre células *in vivo*. O ensaio escolhido para essa avaliação foi o sistema *Allium cepa*, que apresenta grande confiabilidade, além de ter baixo custo, repetibilidade e resultados rápidos. O Teste de *Allium* baseia-se na análise do índice mitótico. Também foi observado o número de alterações cromossômicas a fim de determinar a genotoxicidade e o aspecto macroscópico das raízes em tratamento para análise de toxicidade.

Metodologia

A tintura de Curcumina, utilizada no presente trabalho, foi produzida pelo Laboratório All Chemistry do Brasil®. A tintura tem como solvente o álcool etílico 61º, e apresenta proporção de 20% de Curcumina sobre a razão total do produto. Foram realizados tratamentos com três concentrações diferentes de tintura de Curcumina: C1 - metade da concentração usual (8 gotas/100ml); C2 - concentração usual (15 gotas/100ml); C3 - o dobro da concentração usual (30 gotas/100ml), além do controle negativo em água de torneira. Foram colocados para enraizar em água de torneira, 12 bulbos de *Allium cepa* L., à temperatura de 25 °C em estufa com demanda bioquímica de oxigênio - B.O.D, com aeração constante, até as raízes atingirem o tamanho de 2,0 cm, aproximadamente. Neste ponto, foi coletado um terço das raízes de todos os bulbos para servirem de controle (hora 0). Em seguida, 3 bulbos foram mantidos em água de torneira para servirem de controle negativo e os demais foram submetidos às três concentrações do tratamento. Foram analisadas 3 raízes de cada bulbo e três bulbos por concentração de tratamento, sendo efetuadas coletas de raízes após 24 e 48h de exposição ao tratamento, as quais foram fixadas em Carnoy (3 etanol: 1 ácido acético). Para o preparo das lâminas, as raízes foram reidratadas em água destilada durante 15 minutos e transferidas para o coranteorceína aceto-clorídrica 2%, e aquecidas por três vezes consecutivas sobre chama de lamparina. Após esse processo as raízes foram

retiradas do corante, e cada uma teve sua região meristemática separada sobre lâmina de vidro, a qual recebeu uma gota de ácido acético 45%. Posteriormente, o material foi esmagado entre lâmina e lamínula, e vedado com esmalte incolor para análises.

Em cada lâmina foram contadas 1.000 células, totalizando 108.000 células em todo o experimento. Com estes dados, foram calculados os índices mitóticos (número de células em divisão/número de células analisadas X100) e os índices de fases (número de células em determinada fase/número de células analisadas X100). Também foram observadas as alterações cromossômicas, como micronúcleo, aderência cromossômica e pontes cromossômicas. Após as análises microscópicas, os resultados obtidos a partir das exposições aos tratamentos foram comparados com o controle negativo, por meio do programa estatístico GraphPad Prism 7® utilizando o teste ANOVA. Os experimentos e as análises foram realizados no Laboratório de Mutagênese, do Instituto de Biociências, da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul.

Resultados e Discussão

As raízes expostas aos tratamentos não apresentaram características macroscópicas indicadoras de toxicidade, tais como formação de tumores, espirais e mudança da turgidez das raízes, em nenhuma das concentrações e/ou tempos testados. As raízes tratadas, por 24h e 48h com tintura de Curcumina, na concentração de 8 gotas/100ml (C1 - metade da concentração indicada) não apresentaram alterações significativas dos índices mitóticos. Já as células de raízes tratadas com 15 gotas/100ml (C2 - concentração usual) e 30 gotas /100ml (C3 - dobro da concentração usual) apresentaram diminuição dos índices mitóticos após exposição ao tratamento por 24h e 48h, quando comparadas ao controle negativo, o que foi indicativo de efeitos de citotoxicidade. Não houve mudanças dos índices mitóticos quando comparados os resultados obtidos após 24h e 48h do mesmo tratamento. Os resultados estão representados nas figuras 1 e 2.

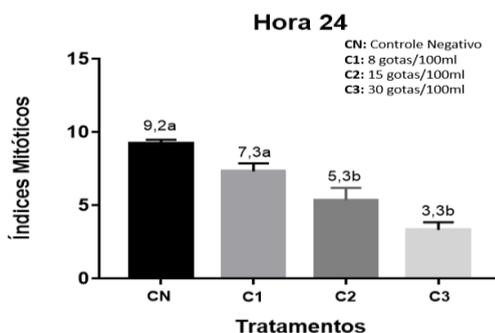


Figura1. Comparação entre índices mitóticos de células meristemáticas de raízes de *Allium cepa* tratadas, por 24h, com três concentrações de tintura de Curcumina e controle negativo. O número superior a coluna indica a média. A barra de erro representa a amplitude dos dados.

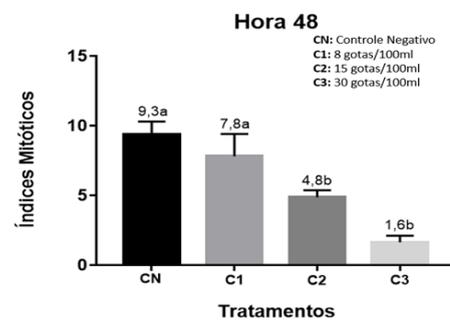


Figura2. Comparação entre índices mitóticos de células meristemáticas de raízes de *Allium cepa* tratadas, por 48h, com três concentrações de tintura de Curcumina e controle negativo. O número superior a coluna indica a média. A barra de erro representa a amplitude dos dados.

Esses resultados convergem com aqueles encontrados por Mendonça et al. (2009), que observaram que a Curcumina, em concentrações elevadas, deixa de desempenhar seu papel protetor, podendo agir no sentido de provocar alterações celulares. Tal fenômeno explicaria a diminuição dose-específica do índice mitótico, acometendo apenas as células das raízes expostas às concentrações 2 e 3 (mais elevadas). Outro fator que ajuda a explicar a alta citotoxicidade observada é a biodisponibilidade, uma vez que no presente experimento as células estavam expostas diretamente a tintura de Curcumina tendo alta disponibilidade, já em quadros de ingestão oral a disponibilidade celular seria bem menor, visto que a molécula teria que sofrer o processo de metabolização (Nogueira, 2010).

O número de alterações cromossômicas clastogênicas encontradas nos tratamentos não foi significativo, quando comparado ao controle negativo. Foi observado um total de 33,76% de células contendo nucléolos volumosos (Figura 3-B), após sua exposição, por 24h, à concentração 2 do tratamento, quando comparadas aos nucléolos normais (Figura 3-A) do controle negativo. Os nucléolos volumosos não foram encontrados em nenhum dos outros tratamentos.

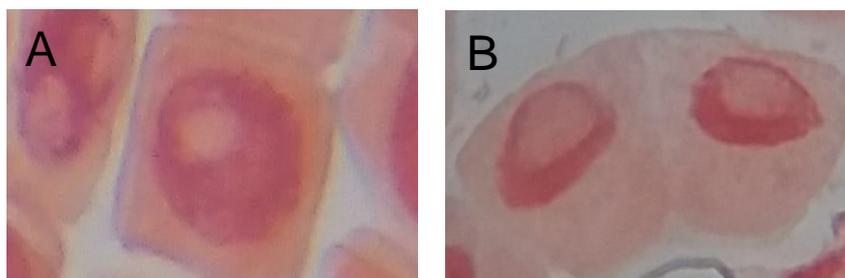


Figura3. Células meristemáticas do bioensaio *Allium cepa* com nucléolos em tamanho normal (A) e aumentado (B).

O nucléolo está em geral associado à síntese proteica da célula, uma vez que a síntese de proteínas está diretamente ligada com a demanda de ribossomos (Junqueira e Carneiro, 2012). Os nucléolos volumosos não foram encontrados em nenhum dos outros tratamentos. Os nucléolos volumosos não foram encontrados em nenhum dos outros tratamentos. Em pesquisa realizada por Succi et al. (2008) com o ensaio *Allium cepa*, foi constatado que o chumbo causava aumento da área e do número de nucléolos, como sinal de citotoxicidade. Trabalho semelhante realizado por Correia et al. (2008), avaliando a toxicidade de cádmio teve resultados semelhantes. Tais resultados, convergem com os observados no presente estudo, indicando que o aumento do nucléolo é sinal de alteração do metabolismo normal da célula.

Conclusões

Os resultados observados no presente estudo indicam uma relação dose-dependente na determinação do potencial citotóxico da tintura de Curcumina, o que foi evidenciado pela redução dos índices mitóticos e aumento do volume dos nucléolos, após exposição das células do bioensaio a partir da dose indicada da tintura para tratamento medicinal. Tais resultados indicam o potencial da Curcumina para futuros estudos, contra células tumorais. Por outro lado, não foi verificado potencial genotóxico do composto estudado, haja vista não ter sido detectado um número significativo de alterações cromossômicas. Embora as mídias venham divulgando nos últimos anos inúmeras promessas sobre o potencial de cura da Curcumina, o presente trabalho (bem como trabalhos anteriores) demonstra que sua utilização deve apresentar cautela, uma vez que a dosagem aplicada é de primordial importância, podendo separar um composto medicinal de um composto citotóxico. Com isso, tornam-se necessários mais estudos que esclareçam os mecanismos que atuam para que a Curcumina, em determinadas concentrações, comporte-se como um agente citotóxico, definindo assim, a dosagem correta recomendada como medicamento em sistemas *in vivo*.

Referências bibliográficas

- CORREIA, T.F.V.C.C.; MASCHIO, L.R.; AZEREDO-OLIVEIRA, M.T.V. Study of the nucleolar alterations in cells of *Allium cepa* after treatment with cadmium heavy metal. In: **Anais do XIV Congresso Brasileiro de biologia Celular**, p203-203, 2008.
- GOEL, A.; KUNNUMAKKARA, A.B.; AGGARWAL, B.B. Curcumin as "Curecumin": from kitchen to clinic. **Biochemical pharmacology**, v. 75, n. 4, p. 787-809, 2008.
- JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. **Biologia Celular e Molecular**. 9 ed. Rio de Janeiro: GuanabaraKoogan,376p, 2012.
- LAMPE, V.; MILOBEDZKA, J.; KOSTANECKI, V. Structure of curcumin. **Ber. Dtsch. Chem. Ges**, v. 43, p. 2163-2170, 1910.
- MATHAI, C.K. The pattern of rhizome yield and their accumulation of commercially importante chemical constituents in turmeric (*Curcuma Spices*) during growth and development. **Qual. Plant-Plant Foods Hum. Nutr.** v. 28, n. 3, p. 219-225, 1979.
- MATOS, R.P.A. Estudo da ação de nanoparticulas associadas à Curcumina em células de carcinoma cervical positivo para HPV-16. **Repositório unesp**: São José do Rio Preto, p. 99, 2017.
- MENDES, P.D.S. Avaliação de atividades antifúngicas da Curcumina sobre fungos deteriorantes de pão. Bachelor`s thesis: **Universidade Tecnológica Federal do Paraná**, p. 33, 2017.
- MENDONÇA, L.M.; DOS SANTOS, G.C.; ANTONUCCI, G.A.; DOS SANTOS A.C.; BIANCHI, M.D.L.P.; & ANTUNES, L.M.G. Evaluation of the cytotoxicity and genotoxicity of curcumin in PC12 cells. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, 675(1), 29-34, 2009.
- MOUNCE, B.C; CESARO, T.; CARRAU, L.; VALLET, T.; VIGNUZZI, M. Curcumin inhibits Zika and chikungunya vírus infection by inhibiting cell binding. **Antiviral research**, v. 142, p. 148-157, 2017.
- NOGUEIRA, S. O veneno do remédio. **Efeitos nocivos limitam potenciais usos terapêuticos**, 2010.
- PÉRET-ALMEIDA, L.; CUNHA, N.C.; AGUIAR, N.E.; JUNQUEIRA, R.G.; & GLÓRIA, M.B.A. Atividade antimicrobiana in vitro do rizoma em pó, dos pigmentos curcuminóides e dos óleos e dos essenciais da *Curcuma longa* L. In vitro antimicrobial activity of the ground rhizome, curcuminoid pigments and essential oil of *Curcuma longa* L. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 32, n. 3, p. 875-881, 2008.
- SUCCI, M; MASCHIO, L.R.; MARIN-MORALES, M.A.; AZEREDO-OLIVEIRA, M.T.V. Avaliação da influência do chumbo (Pd) em sistema-teste de *Allium cepa*, por meio de características nucleolares quantitativas e alterações cromossômicas. In: III Workshop de Ecotoxicologia. **Holos Environmental**, v. 8, p. 18-18, 2008.
- SUGIYAMA, Y.; KAWAKISHI, S.; OSAWA, T. Involvement of the beta-diketone moiety in the antioxidative mechanism of tetrahydrocurcumin. **Biochem Pharmacol**, v.23, n. 4, p. 519-25, 1996.
- SOUSA, J.P.B.D.; BRAINER, M.M.D.A.; ROSÁRIO SILVA, B.C.; LEITE, P.R.D.S.D.C.; SOUZA, J.M.D.; CARVALHO, T. A.; PINTO, V. M. Açafraão em pó (*Curcuma longa* L.) em dieta de frangos de corte. **Colloquium Agrariae**, v. 13, n. 2,

p.97-108, 2018.

VOGEL, H.P.J. Curcumin –biological and medicinal properties. **Journal de Pharmacie I**: 289. 1815.