

Potencial carcinogênico do açafrão (*Curcuma longa* L.) identificado por meio do teste para detecção de clones de tumor em *Drosophila melanogaster*

Priscila Capelari Orsolin

Aluna do Bacharelado de Ciências Biológicas do UNIPAM e bolsista do VIII PIBIC

Júlio César Nepomuceno

Professor Adjunto do Instituto de Genética e Bioquímica da Universidade Federal de Uberlândia-MG; e Professor Titular do Centro Universitário de Patos de Minas - UNIPAM.

Resumo

O açafrão (*Curcuma longa* Linn) é uma herbácea perene, rizomatosa, pertencente à família Zingiberaceae e classificada como planta condimentar. A curcumina é o principal corante presente nos rizomas da cúrcuma. Além de ser utilizada como corante e condimento, apresenta substâncias antioxidantes e antimicrobianas, que lhe conferem a possibilidade de emprego nas áreas de cosméticos, têxtil, medicinal e de alimentos. São ainda reconhecidos os efeitos cicatrizantes e anti-inflamatórios, capacidade de indução de apoptose e de sequestrar radicais livres. Contudo, existem grandes controvérsias com relação à carcinogênese dessa espécie. Sabendo-se disso, o presente trabalho teve por objetivo avaliar o potencial carcinogênico do açafrão, através do teste para detecção de tumor (*wts*) em *Drosophila melanogaster*. Para tanto, foram preparadas três soluções aquosas de açafrão, nas concentrações: 1mg/mL, 3mg/mL, 5mg/mL. O tratamento foi realizado com todas as larvas descendentes do cruzamento de fêmeas *wts*/TM3 com machos *mwh*/*mwh*. Os resultados mostraram que o açafrão apresenta potencial carcinogênico na concentração de 5mg/mL, visto que houve diferença, estatisticamente significativa, na frequência de tumores verificados nesta concentração, em relação à frequência de tumores verificados no controle negativo. Nas concentrações de 1mg/mL e 3mg/mL, não foi verificado potencial carcinogênico, embora tenha havido um aumento na frequência de tumor com o aumento da concentração de açafrão. Concluímos, portanto, que nestas condições experimentais, o extrato aquoso de açafrão induziu a ocorrência de tumores em *D. melanogaster*.

Palavras-chave: Açafrão. *Drosophila melanogaster*. *Wts*. Carcinogênico. Tumor.

Abstract

The saffron (*Curcuma long* Linn) is a herbaceous perennial, rizomatosa, belonging to the family Zingiberaceae and classified as condimental plant. The curcumina is the main dye present in the cúrcuma rhizomes. Besides being used as a dye and condiment, it presents antioxidants and antimicrobial substances, which bring to it the possibility of employment in the fields of cosmetics, textile, medical and food. The healing and anti-inflammatory effects, as well as the ability to induce apoptosis and sequester free radicals are also recognized. However, there are major controversies with respect to carcinogenesis of this species. Taking this into consideration, this study aimed at assessing the carcinogenic potential of saffron through the test for the detection of tumor (*wts*) in *Drosophila melanogaster*. This way, three solutions were prepared from aqueous saffron, in concentrations: 1mg/mL, 3mg/mL, 5mg/mL. The treatment was conducted with all the larvae descending from the intersection of *wts*/TM3 females with males *mwh* / *mwh*. The results showed that the saffron presents carcinogenic potential in the concen-

tration of 5mg/mL since there was statistically significant difference in the frequency of tumors occurred in this concentration, in relation to the frequency of tumors occurred in the negative control. The concentrations of 1mg/mL and 3mg/mL were not found carcinogenic potential, although there has been an increase in the frequency of tumor with increasing concentration of saffron. We conclude, therefore, that in these experimental conditions, the aqueous extract of saffron induce the occurrence of tumors in *D. Melanogaster*.

Key-words: Saffron. *Drosophila melanogaster*. Wts. Carcinogênico. Tumor.

1. Considerações iniciais

Há algumas décadas, o estudo da genética tornou-se essencial para compreender a fisiopatogenia de doenças, visto que os conhecimentos genéticos fornecem base para a compreensão das funções biológicas celulares do organismo, controladas a partir da expressão de genes codificadores de proteínas e enzimas funcionais e para a compreensão da ação de produtos gênicos (LOURO *et al.*, 2002).

Por não ser uma molécula estática, o DNA de um organismo frequentemente apresenta suas bases expostas a agentes naturais ou artificiais, que provocam modificações na sua estrutura ou composição química. Essas lesões podem ser induzidas por agentes químicos, físicos ou biológicos que são prejudiciais às células, uma vez que afetam processos vitais como a duplicação e a transcrição gênica. As alterações podem também causar mutações e aberrações cromossômicas, fenômenos esses que podem levar a processos cancerosos e morte celular (COSTA; MENK, 2000).

Estas alterações do material genético são consideradas mutações quando não resultam em erros na segregação ou recombinação (LEWIN, 2000 *apud* CABRIOTI, 2005), podendo ocorrer em células somáticas ou em células germinativas. Nas células somáticas, elas podem estar relacionadas ao câncer, porém em células germinativas, se a mutação não for letal para a própria célula, tais modificações podem ser transmitidas para as gerações subsequentes, propagando-se pelo corpo em crescimento (CABRIOTI, 2005).

A mutação é a principal fonte de mudanças evolutiva. Através dela surgem novos alelos em todos os organismos, alguns espontaneamente, outros como resultado da exposição à radiação e substâncias químicas no ambiente (GRIFFITHS *et al.*, 2006). As mutações gênicas mais comuns consistem na substituição de um nucleotídeo por outro, na perda (deleção) de um ou vários nucleotídeos, ou na inserção (intercalação) de um ou vários nucleotídeos em uma molécula de DNA. Qualquer que seja o tipo de mutação, ele origina uma troca na informação contida no gene e leva à síntese de uma proteína diferente da esperada ou à ausência de síntese (HIB; ROBERTIS, 1998).

As mutações também podem afetar genes necessários para a sobrevivência das células ou genes envolvidos no controle da multiplicação celular (SANTOS, 2006). No último caso, essa alteração pode levar a um descontrole na proliferação de células, com o consequente aparecimento de quadros cancerígenos (HIB; ROBERTIS, 1998).

No organismo normal, o ciclo de proliferação celular é rigorosamente controlado para que as células constituam comunidades organizadas. No entanto, as células cancerígenas não se submetem a esse esquema de cooperação, são células com o DNA danificado e que, por isso, escapam dos mecanismos de controle do ciclo celular (LOPES *et al.*, 2002).

As mutações carcinogênicas afetam os genes que controlam o nascimento (ciclo celular) ou a morte (apoptose) das células. Nesse sentido, duas grandes categorias de genes são destacadas: os proto-oncogenes e os genes supressores de tumor (READ; STRACHAN, 2002). Os proto-oncogenes são genes relacionados com o crescimento, diferenciação e proliferação celular normais (LOPES *et al.*, 2002). Os genes supressores de tumor impõem alguns limites ao ciclo e ao crescimento celular e, muitas vezes, suprimem algumas propriedades fenotípicas das células tumorais, exercendo uma ação anti-neoplásica (LOURO *et al.*, 2002).

Além das mutações causadas por agentes externos, alterações na molécula do DNA podem surgir durante o processo normal de duplicação. Após modificação na sequência própria do DNA, produtos dos numerosos genes entram em ação para reparar os defeitos produzidos, é a ação dos genes de reparo de DNA. Quando a lesão no DNA é reparada, a célula continua com seu genótipo e fenótipo normais. Se ocorrer uma falha no sistema de reparo, a mutação ocorrida se propaga nas gerações seguintes e pode ser capaz de induzir transformação neoplásica (BRASILEIRO FILHO, 2004).

Uma complexa rede de sistemas de reparo do DNA constitui a principal barreira protetora contra as consequências deletérias de danos no material genético, chamados genes de reparo. Estes genes são responsáveis por produzir enzimas topoisomerases que reparam os genes defeituosos, além de contribuir para a inibição da proliferação celular através de proteínas (FELZENSWALB; PINTO, 2003).

1.1. Dieta e Câncer

A alimentação é importante não só para a manutenção da vida, mas também porque os componentes dos alimentos podem ser bons ou prejudiciais à nossa saúde. A importância da nutrição no caso das doenças crônicas começou a ser discutida na primeira metade do século 19, quando doenças cardiovasculares e o câncer passaram a substituir as doenças infecciosas como as causas mais importantes de mortes prematuras. Os alimentos contêm componentes naturais e sintéticos que tanto podem inibir como promover o processo carcinogênico (MASSABNI, 2006).

O desenvolvimento de várias das formas mais comuns de cânceres resulta de uma interação entre fatores endógenos e ambientais, sendo o mais notável desses fatores a dieta. Acredita-se que cerca de 35% dos diversos tipos de cânceres ocorrem em razão de dietas inadequadas. É possível identificar, por meio de estudos epidemiológicos, associações relevantes entre alguns padrões alimentares observados em diferentes regiões do globo e a prevalência de câncer (AVESANI *et al.*, 2004).

Algumas das substâncias presentes nos alimentos podem ter efeitos mutagênicos e/ou carcinogênicos, isto é, podem induzir mutações no DNA e/ou podem favorecer o desenvolvimento de tumores, enquanto outras podem atenuar ou anular estes efeitos. Muitos compostos presentes nos alimentos, tanto naturalmente, como adicionados ou produzidos durante o processamento, já foram testados quanto à mutagenicidade ou antimutagenicidade em diferentes sistemas experimentais (ANTUNES; ARAÚJO, 2000).

Certos aditivos químicos utilizados na indústria durante o processo de fabricação dos alimentos podem também trazer vários riscos para nossa saúde (SALGADO, 2007), destacando-se entre esses aditivos os corantes alimentícios sintéticos e naturais.

Até 1850 todos os corantes alimentícios provinham de três fontes: vegetais comestíveis, extratos de origem animal ou vegetal, normalmente não consumidos como tais, e resultados da transformação de substâncias naturais. Em 1856, William Henry Perkin sintetizou o primeiro corante, a malva ou malveína. Em 1865, Friedrich Engelhorn fundou a BASF (Badische Anilin - & Soda- Fabrik A G) para produzir corantes derivados do alcatrão de hulha. No final do século 19, mais de 90 corantes eram utilizados pela indústria alimentícia. Em 1906, apareceu nos EUA a primeira legislação relativa à utilização na indústria alimentícia. Somente sete corantes foram autorizados. Desde essa época, pesquisas comprovaram que muitos corantes são tóxicos e podem causar anomalias em recém-nascidos, distúrbios cardíacos ou cânceres (KISSMANN *et al.*, 2004).

De acordo com Antunes e Araújo (2000), a utilização de corantes em alimentos e bebidas é ampla e indispensável para tornar o produto mais vendável. Muitos corantes, entretanto, são proibidos em determinados países, devido à sua ação mutagênica e/ou carcinogênica, enquanto continuam sendo comercializados livremente em outros.

Um grande número de plantas pertencentes à família Zingiberaceae é usado como condimento, corante para alimentos e, também, como medicamento. *Curcuma longa* Linn., espécie mais frequente desta família, é uma erva perene, amplamente cultivada em regiões tropicais, principalmente da Ásia. O pó obtido a partir de seus rizomas, denominado cúrcuma, é usado na culinária como corante e aromatizante, possuindo um aroma característico e sabor amargo, e é um dos principais componentes do *curry*, conferindo a este a cor amarela (ANTUNES; ARAÚJO, 2000).

O pigmento extraído da cúrcuma é um composto fenólico, denominado curcumina. A cúrcuma e a curcumina são usadas para colorir gorduras hidrogenadas, manteiga, queijo, massas, sorvetes, biscoitos e doces, dentre outros alimentos. Não há dúvidas de que a cúrcuma e curcumina são atualmente os corantes para alimentos mais estudados (ANTUNES; ARAÚJO, 2000).

1.2. Açafrão (*Curcuma longa* Linn)

O açafrão da Índia (*Curcuma longa* L.), pertencente à família Zingiberaceae, classificada como planta condimentar, por vezes é confundido, no Brasil, com outra espécie, a

Crocus sativus L., também denominada de açafrão, sendo esta última, no entanto, conhecida como o açafrão verdadeiro. Não obstante, é comum deparar com a regionalização do nome comum da espécie, conhecida também por: açafroeira, açafrão-da-terra, açafrão-da-Índia, batatinha amarela, gengibre dourada e mangarataia (CARVALHO *et al.*, 2001).

Trata-se de uma planta rizomatosa que apresenta um rizoma principal piriforme, arredondado ou ovoide, carnudo com ramificações laterais compridas (PANIZZA, 1997), dando origem à chamada “cúrcuma redonda” (DÍAZ, 2002). Possui um odor agradável, levemente amargo, que lembra o do gengibre (PANIZZA, 1997).

Em sua composição química observa-se a existência de um óleo essencial (3-5%) com sesquiterpenos monocíclicos, sendo os componentes mais importantes e abundantes o zingibereno e derivados oxigenados. Os principais corantes são curcuminoides, compostos relacionados com diarilheptano, em quantidade variável. O composto majoritário (60%), entretanto, é a curcumina (diferuloilmetano), acompanhada de metoxicurcumina, bisdemtoxicurcumina e dihidrocurcumina (DÍAZ, 2002).

A curcumina é uma substância avermelhada, cristalina, insolúvel na água, pouco solúvel no éter, e solúvel nos álcoois metílico e etílico e ácido acético, resultando soluções amarelas com fluorescências verdes. É esta matéria corante que justifica o nome da espécie (PANIZZA, 1997). A curcumina é um corante autorizado que apresenta a vantagem de ser termoestável e pouco sensível as variações de pH (DÍAZ, 2002).

A cúrcuma, produtora de rizomas tradicionalmente conhecidos no mercado internacional como “turmeric”, é considerada uma preciosa especiaria por compor os famosos temperos orientais (DUARTE *et al.*, 1989 *apud* CARVALHO *et al.*, 2001). Entretanto, com a proibição do uso de pigmentos sintéticos nos principais países da América do Norte e Europa, o emprego da cúrcuma deixa de atender tão somente ao mercado condimentar, para disputar o crescente mercado de aditivos naturais de alimentos, principalmente com a finalidade de corante e antioxidante. Além do corante curcumina, a planta possui óleos essenciais de excelentes qualidades técnicas e organolépticas que, juntos, possibilitam estender sua utilização aos mercados de perfumaria, medicinal e têxtil (CECÍLIO FILHO *et al.*, 2000).

Na Índia e China a cúrcuma é utilizada na medicina tradicional para o tratamento de vários tipos de doenças. Inúmeros estudos científicos estão sendo realizados com essa espécie e várias atividades já foram evidenciadas, tais como o efeito cicatrizante, antioxidante, anti-inflamatório, antidepressivo e antineoplásico (BORELLA *et al.*, 2005). Pesquisas também têm destacado a eficácia de seu uso no controle de diversos fitopatógenos (ÁGUILA *et al.*, 2006).

De acordo com Díaz (2002), tradicionalmente a cúrcuma é utilizada na medicina como agente anti-inflamatório e no tratamento de icterícia, hemorragia e cólicas. É empregada como protetor hepático, prevenindo uma toxicidade induzida por tetracloreto de carbono. Possui igualmente uma atividade anti-inflamatória, demonstrada em diversos modelos experimentais. Também tem sido demonstrada certa atividade gástrica, como agente

antiulceroso e citoprotetor. Em cultivos celulares têm-se observado que os curcuminoides são citotóxicos, inibindo as mitoses e produzindo alterações cromossômicas, embora seja desconhecido se as doses administradas em humanos são suficientes para causar tais alterações.

Souza (2005) afirma que a importância das plantas medicinais deve-se a sua contribuição como fonte natural de fármacos e por proporcionar grandes chances de se obter uma molécula protótipo devido à diversidade de constituintes presentes nestas. No entanto, inúmeras plantas que são usadas em preparações fitoterápicas carecem de um maior controle de qualidade, uma vez que a literatura científica indica que muitas destas podem apresentar substâncias tóxicas ou composição química variável.

A utilização de plantas na medicina popular é uma prática realizada há séculos para a cura de doenças. Sua preparação e seu uso apropriado trazem muitos benefícios, porém, seus efeitos fisiológicos, genotóxicos, mutagênicos e carcinogênicos no organismo humano necessitam de maiores investigações (ARAÚJO; NUNES, 2003).

1.3. Teste para detecção de tumor epitelial em *Drosophila melanogaster*

A *Drosophila melanogaster*, conhecida popularmente como mosca das frutas é um organismo eucarionte, da ordem Díptera, largamente utilizado pelos pesquisadores, por ser de fácil manutenção em laboratório, ter um ciclo reprodutivo curto, fornecer um grande número de indivíduos por progênie e apresentar reações metabólicas semelhantes às dos mamíferos, o que permite certo grau de extrapolação para humanos (GRAF, 2006). Além dessas características, apresenta um excelente banco de informações sobre mutações, ecologia e comportamento (FONSECA; PEREIRA, 2004).

Testes bem definidos para verificação da mutagenicidade de agentes físicos e químicos são desenvolvidos em *Drosophila melanogaster*, os quais são capazes de medir um amplo espectro de danos genéticos induzidos em células germinativas, assim como em células somáticas (WÜRGLER *et al.*, 1984 *apud* FARIA, 2006).

A conservação evolutiva de genes supressores de tumor entre *Drosophila* e mamíferos tem estimulado estudos na indução e no desenvolvimento de tumores em *Drosophila*, estudos estes que podem contribuir diretamente para o entendimento de cânceres em seres humanos. Em adição, numerosos proto-oncogenes e supressores de tumores de mamíferos são conhecidos em *Drosophila* (EEKEN *et al.*, 2002).

O gene *warts* (*wts*) foi identificado baseado na sua habilidade para ação como um supressor de tumor em *Drosophila*. A deleção desse gene leva a formação de clones de células que são circulares e consideravelmente invasivas, chamadas de verrugas, que se desenvolvem por todo o corpo da mosca (NISCHIYAMA *et al.*, 1999).

O disco imaginal da *Drosophila* é formado por uma única camada de células, na larva, que durante a metamorfose, se desenvolve nas estruturas da epiderme da mosca adulta.

As células desse disco possuem o controle do ciclo celular similar ao de células somáticas em mamíferos (EEKEN *et al.*, 2002).

No controle das divisões celulares intervêm dois tipos de moléculas: as ciclinas, que receberam esse nome porque no curso de cada ciclo celular alternam um período de síntese crescente seguido por outro de rápida degradação, e as quinases, que ao interagir com as ciclinas, fosforilam e ativam as moléculas responsáveis pela divisão celular (HIB; ROBERTIS, 1998).

O gene *warts* codifica uma proteína denominada serina/threonine Kinase importante na progressão do ciclo celular, especificamente na mitose (NISHIYAMA *et al.*, 1999). O marcador *wts* é uma mutação recessiva letal em homozigose nos zigotos. Devido à letalidade, o alelo *warts* é mantido na linhagem estoque com a presença de um balanceador cromossômico (TM3). Por meio do cruzamento entre linhagens *wts/TM3* com *multiple wing hairs (mwh/mhw)* são obtidas larvas heterozigotas (*wts/+*) (FARIA, 2006).

A perda da heterozigose nas células do disco imaginal da *Drosophila* ocasiona a formação de clones homozigotos (viável em conjuntos de células isoladas) da larva, que se manifestam como tumores na mosca adulta (SIDOROV *et al.*, 2001 *apud* FARIA, 2006), como pode ser verificado nas figuras 1, 2 e 3.



Figura 1. Tumor na asa



Figura 2. Tumor no tórax (corpo)



Figura 3. Tumor na perna

O homem, em sua vida moderna, mantém uma constante interação com agentes químicos, físicos e biológicos. Para tanto, surge a necessidade de se testar agentes químicos, sintéticos e naturais, que estão em grande número em nosso meio ambiente, quanto a possíveis efeitos carcinogênicos e/ou mutagênicos. Agentes químicos ambientais são importantes fatores tanto em termos de desenvolvimento como de prevenção do câncer. Nesse contexto, a avaliação do potencial carcinogênico do açafrão torna-se importante visto que se trata de um corante natural amplamente utilizado. Levando-se em consideração tais aspectos este trabalho teve como objetivo avaliar o potencial carcinogênico do açafrão (*Curcuma longa L*) por meio do teste para detecção de tumor epitelial em *Drosophila melanogaster*.

2. Material e métodos

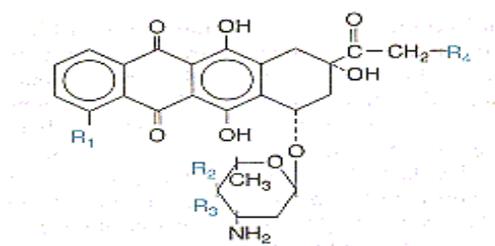
2.1. Obtenção do Açafrão

O pó de cúrcuma (açafrão) utilizado foi obtido comercialmente em Patos de Minas – MG. O mesmo pertence à marca Kodilar® (“açafrão da terra”), produzido pela M.W.A Indústria Alimentícia, lote 127.

Para o tratamento foram utilizadas três diferentes concentrações de extrato aquoso de açafão: 1mg/mL, 3mg/mL e 5mg/mL.

2.2. Agentes químicos

Doxorrubicina (DXR) cloridrato de (8S-cis)-10- [3-amino-2,3,6,-trideoxi-alfa-1lixohexapiranosil)oxi]-7,8,9,10-tetrahidro-6,8,11-trihidroxi-8-(hidroxiacetil)- étoxi5, 12 naftacenodiano (CAS 23214-92-8), Eurofarma Laboratório Ltda, São Paulo, SP, Brasil. Cada frasco contém 10 mg de DXR liofilizado. Possui peso molecular 580,0 e fórmula molecular $C_{27}H_{29}NO_{11}.HCl$.



Sendo: R1 - **OCH₃** R2 - **H** R3 - **OH** R4 - **OH**

Figura 4. Fórmula estrutural da Doxorrubicina.

2.3. Teste para detecção de tumor epitelial em *Drosophila melanogaster*

Para a realização do teste foram utilizadas duas linhagens mutantes de *Drosophila melanogaster* (*wts* e *mwh*) portadoras dos marcadores genéticos *warts* (*wts*, 3-100) e *multiple wing hairs* (*mwh*, 3-0,3).

Os estoques são mantidos no Laboratório de Citogenética e Mutagênese do Centro Universitário de Patos de Minas, em frascos de ¼ de litro contendo meio de cultura de *Drosophila melanogaster* com 820 mL de água, 25g de fermento (*Saccharomyces cerevisiae*); 11g de agar, 156g de banana e 1g de nipagin, à temperatura de 25° C e 60% de umidade.

2.3.1. Cruzamento

Para obtenção de larvas heterozigotas *wts* +/- *mwh*, foi realizado o cruzamento entre fêmeas virgens *wts*/*TM3*, *Sb*¹ com machos *mwh*/*mwh*. Desse cruzamento, todas as larvas foram tratadas com os agentes químicos testados. No entanto foram analisadas somente as moscas que não apresentam o balanceador cromossômico (*TM3*, *Sb*¹), moscas estas que fenotipicamente caracterizam-se pela presença de pelos curtos e grossos.

2.4. Procedimento experimental

2.4.1. Tratamento

A coleta dos ovos dos descendentes dos cruzamentos entre fêmeas virgens *wts*/*TM3*, *Sb*¹ com machos *mwh*/*mwh*, ocorreu durante um período de 8 horas, em frascos

contendo uma base sólida de ágar (3% de ágar em água) e uma camada de fermento biológico (*Saccharomyces cerevisiae*) suplementado com sacarose. Após 48 ± 4 horas as larvas foram lavadas com água destilada e coletadas com o auxílio de uma peneira de malha fina.

Larvas de 2.º estágio, provenientes desse cruzamento foram colocadas em frascos de vidro (2,5 cm de diâmetro e 8,0 cm de altura) contendo 1,5g de meio de purê de batatas instantâneo (marca HIKARI®) e 5mL de extrato aquoso de açafrão nas diferentes concentrações (1 mg/mL, 3 mg/mL e 5 mg/ mL), controle positivo e controle negativo. Para controle positivo foi utilizada a doxorrubicina (DXR- 0,125 mg/mL) e para o controle negativo, utilizou-se água osmose reversa. Pelo fato de haver alguns compostos que são fotossensíveis os frascos foram embalados em papel alumínio.

Larvas de 2.º estágio foram submetidas a um tratamento crônico, por um período de, aproximadamente, 72 horas, quando estas sobem às paredes dos frascos, passando para o estágio de pupa.

2.5. Análises das moscas

Após sofrer metamorfose, os indivíduos adultos foram transferidos para recipientes contendo etanol 70%, e, posteriormente, analisados machos e fêmeas com genótipo (*wts +/+ mwh*) que possuem asas (pelos) fenotipicamente selvagens quanto à presença de tumor. Para a análise das moscas foram utilizadas lupa estereoscópica e pinças entomológicas. A localização de cada tumor observado foi registrada em um diagrama padrão do corpo da mosca.

2.6. Análise estatística

As diferenças estatísticas entre as frequências de tumor nas concentrações testadas e nos controles (positivo e negativo) foram calculadas de acordo com o teste *U*, não-paramétrico, de Mann-Whitney.

3. Resultados

Através da tabela 1 é possível verificar a ocorrência e a frequência de tumores nos diferentes segmentos do corpo da *Drosophila melanogaster* tratadas com as diferentes concentrações de açafrão (*Curcuma longa L.*): 1mg/ mL, 3mg/mL e 5mg/mL.

A avaliação do efeito carcinogênico do açafrão mostra que os descendentes tratados com extrato aquoso de açafrão nas concentrações de 1mg/mL e 3mg/mL não apresentaram aumentos, estatisticamente significativos, nas frequências de tumores, em relação ao controle negativo (água osmose reversa). Entretanto, na concentração de 5mg/mL, houve um aumento, estatisticamente significativo, na frequência de tumores, quando comparado com a frequência encontrada no controle água, o que evidencia o potencial carcinogênico do açafrão nesta concentração.

Tabela 1 – Frequência de tumores observados nos descendentes heterozigotos de *Drosophila melanogaster*, tratados com diferentes concentrações de açafrão.

	Indivíduos (moscas)	Tumores encontrados						Total	Frequência
		Olho	Cabeça	Asa	Corpo	Perna	Halteres		
Controle Água	154	1	4	6	16	2	0	29	0,19*
Açafrão 1mg/mL	234	2	9	9	22	6	0	48	0,20
Açafrão 3mg/mL	237	6	13	9	26	7	2	63	0,27
Açafrão 5mg/mL	209	4	13	12	30	11	2	72	0,34*
DXR 0,125mg/mL	227	11	22	49	91	19	4	196	0,86

* Diferença estatisticamente significativa de acordo com o teste *U* de Mann-Whitney. Nível de significância: $\alpha = 0,05$

4. Discussão

Devido à atribuição de critérios mais rigorosos na avaliação dos componentes da dieta e ao desenvolvimento de novas metodologias, cada vez mais são encontrados agentes mutagênicos e/ou carcinogênicos presentes nos alimentos (ANTUNES; ARAÚJO, 2000).

A presença de diferentes e inúmeros compostos químicos nos alimentos justifica o interesse e a necessidade de se avaliar a inocuidade dos aditivos, bem como de regulamentar seu uso. Desde 1962 o *Committee on Food Additives* (JECFA) é responsável por avaliar sistematicamente o potencial tóxico, a mutagenicidade e carcinogenicidade dos aditivos para alimentos. A cúrcuma e a curcumina foram avaliadas e a ingestão diária aceitável (IDA) estabelecida foi de 2,5 mg/kg e 0,1 mg/kg, respectivamente (ANTUNES; ARAÚJO, 2000).

Com relação à avaliação da mutagenicidade/ antimutagenicidade do açafrão e da curcumina isolada, resultados obtidos por Mukhopadhyay *et al.* (1998), em células da medula óssea de camundongos tratados com a cúrcuma e curcumina, sugerem que estes corantes apresentam potencial mutagênico fraco.

Similarmente, estudo realizado por Antunes *et al.* (1999), com células de ovário de hamster chinês (CHO), para investigar efeitos da curcumina sobre os danos cromossômicos induzidos pela doxorrubicina (DXR), mostrou que a curcumina induz danos cromossômicos em CHO (especialmente em concentrações mais elevadas). Foi verificado ainda um aumento, estatisticamente significativo, da frequência dos danos cromossômicos quando as mais elevadas concentrações de curcumina foram associadas com DXR.

O efeito do açafrão e da curcumina isolada sobre as frequências de aberrações cromossômicas induzidas no ovário do hamster chinês (CHO) por radiação gama foi avaliado por Araújo *et al.* (1999). Nenhum dos dois antioxidantes naturais mostrou efeito protetor contra as radiações. Pelo contrário, foi constatado um considerável aumento na frequência de aberrações cromossômicas quando o açafrão foi associado à radiação (ARAÚJO *et al.*, 1999).

Estudo desenvolvido por Araújo (2004) demonstrou o potencial genotóxico (recombinogênico) do extrato aquoso de *Curcuma longa L.* em *Drosophila melanogaster*, através do teste para a detecção de mutação e recombinação somática, sugerindo que o açafrão poderia ser carcinogênico. Tal resultado foi também encontrado por Fuentes *et al.* (2000), que descreve várias espécies de plantas medicinais com reconhecido potencial genotóxico, dentre as quais está a *Curcuma longa L.*

Contudo, informações contraditórias são obtidas na avaliação da mutagenicidade/antimutagenicidade dos corantes cúrcuma e curcumina. A curcumina é considerada um agente quimiopreventivo e está sendo testada pelo Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos (ANTUNES; ARAÚJO, 2000). Atualmente o uso da cúrcuma na prevenção e tratamento do câncer tem sido objeto de intensas pesquisas. Trabalhos recentes vêm demonstrando a atividade adjuvante da curcumina no tratamento do câncer por meio de uma ação imunoestimuladora (FERRO; SOUZA, 2003).

Algumas outras atividades são relatadas para curcumina na literatura, como por exemplo, indutora da apoptose de células cancerígenas (FERRARI; TORRES, 2002), inibidora da integrase tipo-1 do HIV (MAZUMDER *et al.*, 1995 *apud* ANTUNES; ARAÚJO, 2000), inibidora das funções SOS induzidas pela radiação ultra-violeta e inibidora da expressão dos proto-oncogenes c-fos, c-jun e c-myc (KALKAR; ROY, 1994 *apud* ANTUNES; ARAÚJO, 2000).

Outros trabalhos demonstram que a cúrcuma e curcumina inibem a peroxidação lipídica, exercendo também importante atividade citotóxica, antioxidante e anti-inflamatória (DEWITT *et al.*, 2000). O potencial antioxidante de *Curcuma longa L.* foi verificado *in vivo* e *in vitro* atuando, provavelmente, pelo sequestro de espécies reativas de oxigênio (KUNCHANDY; RAO, 1990).

No presente estudo, entretanto, foi constatado o potencial carcinogênico do extrato aquoso de *Curcuma longa L.*, na concentração de 5mg/ mL. Embora verificado tal potencial os mecanismos pelos quais o referido extrato induziu o desenvolvimento de células tumorais em *Drosophila melanogaster* não são exatamente claros.

De acordo com Ascher *et al.* (2005), a curcumina em altas doses em cultura celular estimula a degradação da proteína p53, responsável por evitar o crescimento de células cancerosas ou por induzir a morte delas e, conseqüentemente, favorece o aparecimento do tumor. Tal degradação ocorre em conseqüência da inibição da enzima NQO1, que regula a quantidade de proteína p53 existente na célula.

O gene p53, considerado como o "guardião do genoma", dentre todos aqueles reconhecidamente envolvidos nos processos de carcinogênese, é o de maior importância. Sendo assim, a compreensão de aspectos da biologia molecular do câncer depende do entendimento do funcionamento deste gene (FETT- CONTE; SALLES, 2002).

O p53 é um gene supressor tumoral, que codifica uma fosfoproteína nuclear que desempenha um papel importante no controle do ciclo celular, no reparo do DNA e na indu-

ção da apoptose. Em condições de stress, particularmente por indução de dano no DNA, a proteína p53 bloqueia o ciclo celular permitindo, dessa forma, o reparo do DNA ou promovendo a apoptose. Estas funções são efetuadas pela capacidade transcricional da proteína p53 que ativa uma série de genes envolvidos na regulação do ciclo celular. A forma mutada da p53 é incapaz de controlar a proliferação celular, resultando em reparo ineficiente do DNA e na emergência de células geneticamente instáveis (cancerígenas) (CAVALCANTI JÚNIOR *et al.*, 2002). Da mesma forma, a degradação dessa proteína inibe a supressão tumoral, favorecendo a sobrevivência de células cancerígenas e, conseqüentemente, favorecendo a proliferação do tumor (STIX, 2007).

Sendo assim, o potencial carcinogênico verificado no extrato aquoso de açafrão na concentração de 5mg/mL, pode ser justificado em virtude da ocorrência de uma possível degradação da proteína p53 que, nessa situação, não é capaz de realizar a supressão tumoral.

5. Conclusão

O teste para a detecção de clones de tumor em *Drosophila melanogaster* foi eficiente para identificar o potencial carcinogênico do extrato aquoso de açafrão na concentração de 5mg/ mL.

A cúrcuma e a curcumina são, atualmente, os corantes alimentícios mais consumidos, especialmente em nossa região, e também os corantes naturais mais estudados. Porém, ainda há grandes contradições com relação aos efeitos destes corantes na carcinogênese. Vários estudos demonstram o potencial mutagênico, carcinogênico do açafrão, enquanto vários outros demonstram atividade antimutagênica e anticarcinogênica. São necessários, portanto, novos estudos dessa natureza com a *Curcuma longa L.* e seus princípios isolados, utilizando diferentes metodologias e diferentes organismos testes.

Referências

ÁGUILA, M.; FRANZENER, G.; KUHN, O.J. PORTZ, R.L; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F; STANGARLIN, J. R. Efeito do extrato aquoso de cúrcuma (*Curcuma longa*) em *Xanthomonas axonopodis* pv. *Manihotis*. *Ciências Agrárias*. Londrina, v. 27, n. 1, p. 13-20, jan./mar, 2006.

ANTUNES, L. M. G; ARAÚJO, M. C. P. Mutagenicidade e antimutagenicidade dos principais corantes para alimentos. *Revista de Nutrição*. Campinas, 13(2): 81-88, mai./ago., 2000.

ANTUNES, L. M. G., ARAÚJO, M. C. P., DIAS, F. L., TAKAHASHI C. S. Modulatory effects of curcumin on the chromosomal damage induced by doxorubicin in Chinese hamster ovary cells. *Teratogenesis: Carcinogenesis and Mutagenesis*, New York, v.19, n.1, 1999.

ARAÚJO, Bethânia Cristhine de. *Atividade recombinogênica induzida pelo açafrão (Curcuma longa L.) em células somáticas de Drosophila melanogaster*. 2004. Monografia de

graduação Curso de Ciências Biológicas, Centro Universitário de Patos de Minas, Patos de Minas, 2004.

ARAÚJO, M. C. P., DIAS, F. L., TAKAHASHI, C. S. Potentiation by turmeric and curcumin of γ -radiation-induced chromosome aberrations in Chinese hamster ovary cell. *Teratogenesis: Carcinogenesis and Mutagenesis*, New York, v.19, n.1, 1999.

ARAÚJO, A. C.; NUNES, A. P. M. ; Ausência de genotoxicidade do esteviosídeo em *E. coli*. *X Semana de Iniciação Científica da UERJ*. Rio de Janeiro, 2003. Anais.

ASHER, G.; LOTEM, J.; REISS, V.; SACHS, L.; SHAUL, Y.; TSVETKOV, P. Inhibition of NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 activity and induction of p53 degradation by the natural phenolic compound curcumin. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, v. 102, abril 2005.

AVESANI, C. M.; BARROS, M. E.; CAMARGO, K. G.; GAROFOLO, A.; SIGULÉM, D. M.; SILVA, S. R. J.; TADDEI, J. A. A. Dieta e câncer: um enfoque epidemiológico. *Revista de Nutrição*. Campinas, 17(4):491-505, out./dez., 2004.

BORELLA, J. C.; FRANÇA, S. C; MASCA, M. G. C. C; o J. R. Efeitos do tipo de rizoma de multiplicação e da cobertura morta no desenvolvimento e produtividade de cúrcuma (*Curcuma longa L.*). *Revista Brasileira Plantas Medicinai*s. Botucatu, v.8, n.1, p.30-34, 2005.

BRASILEIRO FILHO, Geraldo. *Bogliolo Patologia Geral*. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

CABRIOTI, Leonardo Neves. *Estudo da antigenotoxicidade, genotoxicidade e citotoxicidade de frações do extrato metanólico de Agaricus blazei in vitro*. 2005. Dissertação- Genética e Biologia Molecular, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2005.

CARVALHO, C. M; CECÍLIO FILHO, A. B, SOUZA, R.J. Produtividade da cúrcuma (*Curcuma longa L.*) cultivada em diferentes densidades de plantio. *Ciências agrotécnicas*. Lavras, v.25, n.2, p.330-335, mar./abr., 2001.

CAVALCANTI JÚNIOR, G. B.; KLUMB, C. E.; MAIA, R.C. P53 e as hemopatias malignas / p53 and hematological malignancies. *Revista brasileira de cancerologia*. 48(3):419-427, jul.-set. 2002.

CECÍLIO FILHO, A. B.; SOUSA, R. J.; BRAZ, L. T., TAVARES, M. Cúrcuma: planta medicinal, condimentar e de outros usos potenciais. *Ciência Rural*. Santa Maria, v. 30, n. 1, p.171-175, 2000.

COSTA, R. M. A.; MENK, C. F. M. Biomonitoramento de mutagênese ambiental. *Biotecnologia: ciência e desenvolvimento*, v.3, n.12, 2000.

DEWITT, D. L.; NAIR, M. G.; RAMSEWAK. Cytotoxicity, antioxidant and anti-inflammatory activities of curcumins I-III from *Curcuma longa*. *Phytomedicine*, (4):303-8, julho 2000.

DÍAZ, Luis Bravo. *Farmacognosia*. Madrid: Elsevier, 2002.

EEKEN, J. C. J.; KLINK, I.; VEEN, B. L. V; FERRO, W. Induction of epithelial tumors in *Drosophila melanogaster* heterozygous for the tumor suppressor gene wts. *Enviromental and Molecular Mutagenesis*, 2002; 40: 277-282.

FARIA, M. I. de. *Efeito anticarcinogênico da graviola (Annona muricata) por meio do teste para detecção de clones de tumor (warts) em Drosophila melanogaster*. 2006. Monografia de Graduação Curso de Ciências Biológicas, Centro Universitário de Patos de Minas, Patos de Minas, 2006.

FELZENSZWALB, I.; PINTO, L. F. R. Genética do Câncer Humano. *Mutagênese Ambiental*. Canoas: ULBRA, 2003.

FERRARI, C. K. B.; TORRES, E. A. F. S. Novos compostos dietéticos com propriedades anticarcinogênicas. *Revista Brasileira de Cancerologia*, 48(3): 375-382, 2002.

FERRO, Ana Flávia Portilho; SOUZA, Mary Luci. Estudo da atividade antitumoral do extrato da *Curcuma longa* Linn. XI Congresso Interno de Iniciação Científica da UNICAMP, Campinas, 2003.

FETT-CONTE, Agnes C.; SALLES, Andréa B.C.F. A importância do gene *p53* na carcinogênese humana. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, v. 24, n. 2, São José do Rio Preto, abr/jun. 2002.

FONSECA, C.A; PEREIRA, D. G. Aplicação da genética toxicológica em planta com atividade medicinal. *Informa*, v.16, n7-8, 2004.

FUENTES; D. F; LAMAR, A. S; LÓPEZ, G. F.; TRUJILLO, N. C. Propuesta de ruta crítica para la evaluación genotóxica de plantas medicinales en Cuba. *Revista Cubana de Farmácia*, v.34, n.1, Ciudad de la Habana, 2000.

GRAF, U. The Actual Situation of SMART (Somatic Mutation and Recombination Test) in *D. melanogaster*. *Environmental Mutagenesis*, v.6, n.2, 2006.

GRIFFITHS, A. J. F; GELBART, W. M.; LEWONTIN, R. C.; MILLER, J. H; SUZUKI, D.T; WESSLER, S. R. *Introdução à genética*. 8 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.

HIB, J.; ROBERTIS, E. M. F. *Bases da biologia celular e molecular*. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998.

KISSMANN, T. W.; PETTER, A. G.; ROSA, E. B. *Histórico do uso de corantes*. Disponível em: <<http://www.ufrgs.br/Alimentus/ped/seminarios/2004/corantes.doc>>. Acesso em: 23/04/07.

KUNCHANDY, E., RAO, M.N.A. Oxygen radical scavenging activity of curcumin. *International Journal of Pharmaceutics*, v.58, 1990.

LOPES, A. A.; OLIVEIRA, A. M. PRADO, C. B. C. Principais genes que participam da formação de tumores. *Revista de Biologia e Ciências da Terra*, vol.2, n.2, segundo semestre, 2002.

LOURO, I. D; LLERENA Jr., J.C.; MELO, M. S. V.; ASHTON-PROLLA, P.; CNFORTI, N. F. *Genética Molecular do Câncer*. 2.ed. São Paulo: MSG Produção Editorial, 2002.

MASSABNI, A.C. *Ciência e Saúde: a importância da alimentação na prevenção do câncer*, 2006. Disponível em: <http://www.jornaloimparcial.com.br/pagina_indice.asp?iditem=101>. Acesso em: 14/05/07.

MUKHOPADHYAY, M.J., SAHA, A., MUKHERJEE, A. Studies on the anticlastogenic effect of turmeric and curcumin on cyclophosphamide and mitomycin C in vivo. *Food and Chemical Toxicology*, Oxford, v.36, n.11, 1998.

NISHIYAMA, Y.; HIROTA, T.; MORISAKI, T.; HARA, T.; MARUMOTO, T.; IADA, S.; MAKINO, K.; YAMAMOTO, H.; HIRAOKA, T.; KITAMURA, N.; SAYA, H. A human homolog of *Drosophila* warts suppressor, h-warts, localized to mitotic apparatus and specifically phosphorylated during mitosis. *Febs Letters*, 1999; 459: 159-165.

PANIZZA, Sylvio. *Plantas que curam: cheiro de mato*. 17 ed. São Paulo: IBRASA, 1997.

READ, A. P.; STRACHAN, T. *Genética molecular humana*. 2 ed. Porto Alegre: Editora Art-med, 2002.

SALGADO, Joclem Mastrodi. *Nutrição e Câncer*. Disponível em: < <http://www.uol.com.br/vyaestelar/nutricao05.htm>>. Acesso em: 16/04/07.

SANTOS, Renato. *Prevenção, diagnóstico precoce e tratamento de câncer*. 2006. Centro avançado de Prevenção do Câncer. Disponível em: <http://www.prevencaodecancer.com.br/002_b.htm>. Acesso em: 16/04/07.

SOUZA, S.A.M. *Biotestes na avaliação da fitotoxicidade de extratos aquosos de plantas medicinais nativas do Rio Grande do Sul*. 2005. Monografia Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2005.

STIX, Gary. Tempero que cura: é possível que um ingrediente do curry trate doenças como Alzheimer e câncer? *Scientific American*. Brasil, ano 5, n. 58, março 2007.