

Avaliação da nanotoxicidade de curcumina em *Drosophila melanogaster*

Evaluation the nanotoxicity of curcumin in *Drosophila melanogaster*

Camila Maria Marinho Leme
camila.mleme27@gmail.com
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campo Mourão, Paraná, Brasil

Igor Silva de Sá
saiqors@outlook.com
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campo Mourão, Paraná, Brasil

Aline Coqueiro
alinedq@gmail.com
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campo Mourão, Paraná, Brasil

Odinei Hess Gonçalves
odinei@utfpr.edu.br
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campo Mourão, Paraná, Brasil

Rafael Porto Ineu
rafaelineu@utfpr.edu.br
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campo Mourão, Paraná, Brasil

RESUMO

A curcumina é um composto bioativo extraído do rizoma da Cúrcuma e vem sendo muito estudada devido as suas propriedades antioxidantes e anticancerígenas. O objetivo deste trabalho foi analisar a toxicidade de nanopartículas de curcumina encapsuladas com Poloxamer 407 (PLX-Curc) em *Drosophila melanogaster* através da porcentagem de sobrevivência durante 7 dias de tratamento. Para este estudo foram utilizadas moscas de ambos os sexos e com dois dias de idade sincronizada. PLX-Curc foi empregada em doses finais de 10, 30 e 100 μM (adicionadas diretamente ao meio de cultura). No último dia de tratamento os tecidos das moscas sobreviventes foram homogeneizados para a determinação da concentração de dopamina em HPLC. A maior porcentagem de sobrevivência no dia 7 de tratamento ocorreu no grupo de moscas tratadas com PLX-Curc na dose de 10 μM . Quando comparado com o grupo controle, todos os tratamentos aumentaram consideravelmente os níveis de dopamina. Com base nessas evidências, supomos que a curcumina pode atuar de maneira protetiva no sistema nervoso e a PLX-Curc na concentração de 10 μM pode ser utilizada em estudos futuros em *Drosophila melanogaster* pois não apresentou toxicidade.

PALAVRAS-CHAVE: Polímeros. HPLC. Neurotransmissor. Memória. Bioativos.

ABSTRACT

Curcumin is a bioactive compound extracted from the Curcuma rhizome and has been extensively studied because of its antioxidant and anticancer properties. The objective of this work was to analyze the toxicity of curcumin nanoparticles encapsulated with Poloxamer 407 (PLX-Curc) in *Drosophila melanogaster* through the percentage of survival during 7 days of treatment. Flies of both sexes and two-day-old synchronized were used for this study. PLX-Curc was used in final doses of 10, 30 and 100 μM (added directly to the culture medium). On the last day of treatment the tissues of the surviving flies were homogenized for the determination of dopamine concentration in HPLC. The highest percentage of survival on day 7 of treatment occurred in the group of flies treated with PLX-Curc at the dose of 10 μM . When compared to the control group, all treatments significantly increased dopamine levels. Based on this evidence, we assume that curcumin can act in a protective way in the nervous system and PLX-Curc at 10 μM concentration can be used in future studies in *Drosophila melanogaster* because it did not present toxicity.

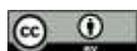
KEYWORDS: Polymers. HPLC. Neurotransmitter. Memory. Bioactive.

Recebido: 31 ago 2018

Aprovado: 04 out 2018

Direito autoral:

Este trabalho está licenciado sob os termos da Licença Creative Commons-Atribuição 4.0 Internacional.



INTRODUÇÃO

Os fitoconstituintes são constituídos por compostos bioativos benéficos a saúde e ao bem-estar. Há inúmeras pesquisas sobre estes benefícios e princípios ativos em diferentes modelos de distúrbios neurodegenerativos humanos (PRASAD e MURALIDHARA, 2014).

Um desses bioativos é a curcumina, que tem seu uso na forma de temperos, medicamento fitoterápico e aditivo na indústria alimentícia (ZHANG et al., 2013). A curcumina vem sendo estudada devido as suas propriedades antioxidantes e anticancerígenas (SUCKOW e SUCKOW, 2006). Entretanto, apresenta limitada disponibilidade e baixa solubilidade em água. Isto ocorre provavelmente pelo fato da mesma ser um polifenol de baixa solubilidade, absorção celular e estabilidade (PANDAREESH et al., 2016). Compostos bioativos são, geralmente, insolúveis em água e parcialmente em temperatura ambiente e suscetíveis ao oxigênio, luz e calor. A encapsulação pode melhorar sua solubilidade e sua preservação durante processos de fabricação (HORUZ, e BELIBAGLI, 2018).

Modelos experimentais alternativos vem sendo utilizados para a verificação da toxicidade de biocompostos. Dentre eles, a *Drosophila melanogaster* (DM) apresenta alta sensibilidade a substâncias tóxicas e seu uso promove os 3Rs (redução, refinamento e substituição) da utilização de animais de laboratórios em testes de toxicidade (ADEDARA et al., 2015). Estes modelos alternativos podem estabelecer um potencial seguro ou de risco de um grande número de fitoconstituintes e melhorar o entendimento dos mecanismos da atividade biológica (BIANCHINI et al., 2016). O presente trabalho tem como objetivo verificar a toxicidade de nanopartículas de curcumina encapsuladas em Poloxamer 407 utilizando DM como modelo biológico experimental.

MATERIAIS E MÉTODOS

CULTURA E CRIAÇÃO DE *Drosophila melanogaster*

As *Drosophila melanogaster* foram mantidas e criadas sob condições padrão (23 ± 1 °C, 50% de umidade relativa). Foram utilizadas moscas machos e fêmeas, adultas, sincronizadas por idade (2 dias de vida) em frascos de vidro (50 moscas por frasco) contendo 20 mL de meio e 1 mL de composto em diferentes doses.

PREPARAÇÃO DOS MEIOS

Em 100 mL de água destilada solubilizou-se 1,0 g de fermento biológico, 1,0 g de sacarose, 1,0 g de leite em pó, 1,0 g de ágar e 0,08 g de metilparabeno (previamente preparado em etanol). Transferiu-se 20 mL do meio para os frascos de vidro e foi adicionado 1 mL de água, Poloxamer 407 ou curcumina encapsulada conforme o tipo de tratamento. Esses foram distribuídos da seguinte maneira: controle, PLX [100 μ M] final, NP-PLX nas concentrações finais de 10 μ M, 30 μ M e 100 μ M (moscas mantidas em ágar e água, ágar e Poloxamer 407 com concentração final de 100 μ M, ágar e curcumina encapsulada com Poloxamer 407 em concentração de 10, 30 e 100 μ M, respectivamente).

PREPARAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS

Kolliphor® P 407 (3,600g, Sigma-Aldrich) e Tween 80 P.S. (0,360g, Dinâmica) foi solubilizada em acetona (36 mL) com auxílio de agitação magnética em temperatura ambiente até total dissolução. Posteriormente, curcumina (0,360g, Sigma-Aldrich, 99,5%) foi adicionado à solução e agitou-se por 1 minuto e então a mistura foi submetida a sonicação (Fisher Scientific, 120W, ponta CL-18) por 10 minutos, em banho de gelo, com a configuração de 30 segundos de pulso e 10 segundos de pausa. Levou-se a dispersão obtida para evaporação em estufa (CIENLAB) com circulação e renovação de ar em 50°C, por 12 horas.

PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS

Após os 7 dias de tratamento, os tecidos das *DM* sobreviventes foram homogeneizados com água ultrapura. Foi empregado 10 µL de água ultrapura para cada *DM* sobrevivente. O homogeneizado foi centrifugado durante 10 minutos à 14000 rpm. Depois da centrifugação separou-se o sobrenadante (S1) da fração precipitada para realizar os testes em HPLC. Os tecidos homogeneizados foram separados nos seguintes grupos: H₂O, PLX, 10, 30 e 100 (tecidos de moscas do grupo controle, somente Poloxamer 407, curcumina encapsulada nas concentrações de 10,30 e 100 µM, respectivamente).

REAGENTES QUÍMICOS

Para as análises cromatográficas foram utilizados: metanol grau HPLC (Panreac, EU), ácido fosfórico grau analítico (Exôdo Científica, Hortolândia-SP, Brasil), água ultrapura obtida através de um dispositivo Milli-Q (Milipore, São Paulo, Brasil) e padrão de cloridrato de dopamina adquirido da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA).

INSTRUMENTAÇÃO E CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS

As separações e quantificações foram realizadas utilizando um cromatógrafo Dionex, UltiMate 3000-Thermo Scientific, equipado com uma bomba analítica quaternária (modelo LPG-3400SD Dionex), um sistema de amostragem automático (modelo WPS-3000TSL, Dionex) operando a 10 °C e com um detector de arranjo de fotodiodos (modelo DAD-3000 Dionex). As separações foram realizadas em uma coluna C₁₈, Acclaim® 120 (Alemanha), com 250 x 4,6 mm, 5 µm e 120 Å, equipada com pré-coluna, operando a 40 °C com fluxo de 1 mL.min⁻¹ e detecção no UV ($\lambda = 280$ nm). A fase móvel foi composta por dois solventes, solvente A (Água com ácido fosfórico a pH 3,0) e solvente B (Metanol). Todas as soluções foram degaseificadas e filtradas através de um filtro com poros de tamanho de 0,45 µm (Milipore, EUA). A separação foi realizada usando um programa de gradiente de eluição como segue: 0–10 min (5% B), 10–12 min (5–80% B), 12–16 min (80–100% B), 16–21 min (100% B), 21–25 min (100–5% B), 25–31 min (5% B). As amostras e o padrão foram filtrados através de um filtro de seringa de nylon de 0,45 µm e 10 µL foram injetados. As quantificações foram executadas utilizando curva de calibração por padrão externo. A solução estoque

de dopamina foi preparada em uma concentração de $1,0 \text{ mg.mL}^{-1}$ e a curva de calibração foi preparada a partir desta solução estoque em concentrações de 1,0; 0,8; 0,5; 0,3; 0,2; 0,1; 0,05; 0,025; 0,010 mg.mL^{-1} . O limite inferior de detecção (LD) e o limite inferior de quantificação (LQ) foram calculados a partir da curva de calibração usando a equação da reta (Equação 1), de acordo com SHRIVASTAVA e GUPTA, (2011).

$$LD/LQ = \frac{F \times SD}{b} \quad (1)$$

Onde:

F = Fator de 3,3 e 10 para LD e LQ, respectivamente.

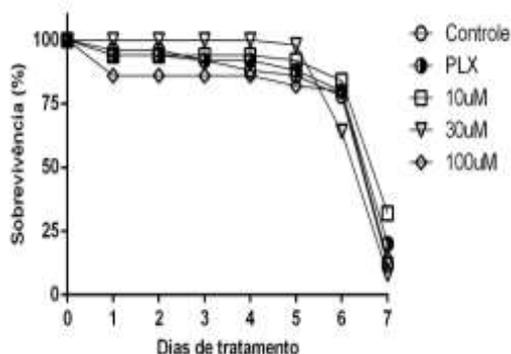
SD = Desvio padrão residual da regressão linear.

b = Inclinação (*slope*) ou coeficiente angular da curva analítica.

RESULTADO E DISCUSSÕES

Na análise de sobrevivência da *DM* foi notável que no dia 6 houve uma maior taxa de mortalidade das moscas que foram tratadas com curcumina encapsulada na concentração de $30 \mu\text{M}$. A porcentagem de sobrevivência no dia 7 foi a mesma para o controle e curcumina encapsulada na concentração de $10 \mu\text{M}$. *DM* tratadas com curcumina encapsulada na concentração de $30 \mu\text{M}$ permaneceram com a menor taxa de sobrevivência no dia 7 (Figura 1).

Figura 1 – Gráfico da porcentagem de sobrevivência de *Drosophila melanogaster* durante 7 dias de tratamento



Fonte: Próprio autor.

Prasad e Muralidhara (2014) analisaram o efeito neuroprotetor da curcumina livre nas concentrações de 5 e $10 \mu\text{M}$ sobre a mortalidade induzida por acrilamida em *DM*. Já Akinyemi et al. (2018) verificou a porcentagem de sobrevivência em modelos de *DM* tratadas com curcumina livre nas concentrações de 0,2 e $1,0 \text{ mg.g}^{-1}$. Para analisar o efeito da curcumina na idade de *DM*, Zhang et al. (2013) fez o uso deste composto em dose de $100 \mu\text{mol.L}^{-1}$.

A mistura de água com ácido fosfórico a pH 3,0 e metanol, proporcionou a melhor separação. A identidade da dopamina nas amostras foi confirmada por comparação do tempo de retenção e espectro de UV com o padrão autêntico. O método analítico foi considerado linear na faixa de 0,010 a $0,8 \text{ mg.mL}^{-1}$ com

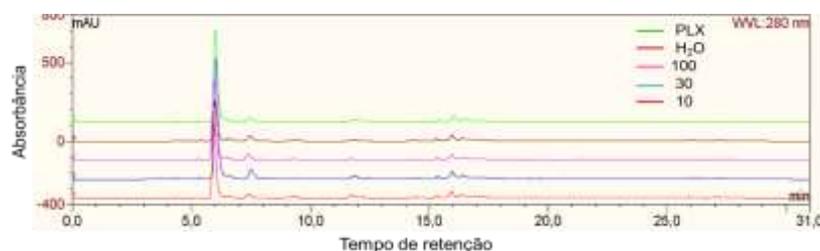
coeficiente de correlação (R^2) de 0,9999. A equação da reta obtida a partir dos resultados experimentais para dopamina está representada pela Equação 2:

$$y = 171,66x - 0,8745 \quad (2)$$

Os valores do LD e LQ para dopamina foram de $13,98 \mu\text{g.mL}^{-1}$ a $42,37 \mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente.

A curva de calibração obtida por HPLC-DAD foi utilizada para quantificar a concentração de dopamina em amostras de tecidos de *DM* de todos os tratamentos. A dopamina apresentou um tempo de retenção de 5,95 min (Figura 2). A concentração de dopamina nas diferentes amostras é mostrada na Tabela 1.

Figura 2 - Cromatograma de extrato bruto de tecido de *Drosophila melanogaster* tratadas com água (H_2O), Poloxamer 407 (PLX) e curcumina encapsulada nas concentrações de 10, 30 e 100 μM em 280 nm; dopamina $R_t = 5,95$ min.



Fonte: Próprio autor.

Tabela 1 – Quantificação de dopamina em tecido de *Drosophila melanogaster* tratadas com água (H_2O), Poloxamer 407 (PLX) e curcumina encapsulada nas concentrações de 10, 30 e 100 μM

Amostra	Concentração ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)
10	505,83
30	842,78
100	543,72
H_2O	299,82
PLX	684,70

Fonte: Próprio autor.

A dopamina desempenha um papel de regulador central em insetos, especificamente nas redes neurais controlando a atividade locomotora e os comportamentos estereotipados (PRASAD; MURALIDHARA, 2014). Os níveis de dopamina em *DM* tiveram um aumento considerável em todos os tratamentos quando comparado com as moscas da amostra controle. Estes resultados indicam que a curcumina encapsulada com Poloxamer 407 pode colaborar com melhoras no sistema nervoso.

CONCLUSÃO

Através deste estudo observamos que uma dieta na qual a curcumina nanoencapsulada esteja presente, a mesma, é capaz de trazer benefícios ao



sistema nervoso. A técnica de encapsulação de partículas torna este composto mais biodisponível para o organismo, uma vez que a solubilidade do mesmo em água aumenta. Mais estudos futuros utilizando curcumina em modelos de *Drosophila melanogaster* poderão ser realizados a partir da concentração de 10 μ M, para a qual a porcentagem de sobrevivência das moscas foi maior.

REFERÊNCIAS

ADEDARA, I. A. et al. Influence of diphenyl diselenide on chlorpyrifos-induced toxicity in *Drosophila melanogaster*. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, 2015.

AKINYEMI, A. J. et al. Curcumin-supplemented diets improve antioxidant enzymes and alter acetylcholinesterase genes expression level in *Drosophila melanogaster* model. **Metabolic Brain Disease**, 2018.

BIANCHINI, M. C. et al. *Peumus boldus* (Boldo) Aqueous Extract Present Better Protective Effect than Boldine Against Manganese-Induced Toxicity in *D. melanogaster*. **Neurochemical Research**, 2016.

PANDAREESH, M. D. et al. Curcumin Monoglucoside Shows Improved Bioavailability and Mitigates Rotenone Induced Neurotoxicity in Cell and *Drosophila* Models of Parkinson's Disease. **Neurochemical Research**, 2016.

PRASAD, S. N.; MURALIDHARA. Neuroprotective effect of geraniol and curcumin in an acrylamide model of neurotoxicity in *Drosophila melanogaster*: Relevance to neuropathy. **Journal of Insect Physiology**, 2014.

SHRIVASTAVA, A.; GUPTA, V. Methods for the determination of limit of detection and limit of quantitation of the analytical methods. **Chronicles of Young Scientists**, 2011.

SUCKOW, B. K.; SUCKOW, M. A. Lifespan extension by the antioxidant curcumin in *Drosophila melanogaster*. **International journal of biomedical science : IJBS**, 2006.

ZHANG, Z. GUO et al. Effect of curcumin on aged *Drosophila Melanogaster*: A pathway prediction analysis. **Chinese Journal of Integrative Medicine**, 2013.

AGRADECIMENTOS

Agradeço meu orientador pela oportunidade de participar deste projeto e assim ampliar meus conhecimentos nesta área de estudo e também ao DIRPPG-CM pela oportunidade de ser bolsista PVICT da Fundação Araucária 2017/2018.



Grata também aos colaboradores deste trabalho que não mediram esforços para me auxiliar durante todo o processo.