

## **AValiação DA CITOTOXICIDADE DE CURCUMINÓIDES EM CÉLULAS LINFOCITÁRIAS NORMAIS**

### **EVALUATION OF CYTOTOXICITY OF CURCUMINOIDS IN NORMAL LYMPHOCYTE CELLS**

Artigo Original

Eveline Schmidt Bicalho Otoni <sup>(1)</sup>

Jeanine Marie Nardin <sup>(2)</sup>

#### **RESUMO**

A *Curcuma longa* L., comumente conhecida como açafrão, apresenta várias características diferenciadas que possibilitam sua utilização em várias áreas, tais como a medicinal. Em seu rizoma pode-se encontrar importante metabólitos farmacologicamente ativos, estes são classificados como curcuminóides. A curcumina, seu principal curcuminóide, é o fitoquímico mais estudado por sua diversidade de ação, sobretudo pela atividade anticarcinogênica, por meio da indução de apoptose, bloqueio de proliferação e redução da angiogênese. Frente à diversidade de ação de tal curcuminóide sobre células neoplásicas, este estudo teve como objetivo estudar a toxicidade de curcuminóides em células fisiologicamente saudáveis através de cultivo celular. Para tal o extrato bruto do rizoma da *Curcuma longa* L. teve a separação de seus compostos que foram submetidos à cromatografia e o produto isolado com o solvente clorofórmio foi testada no cultivo de células linfocitárias normais. As células linfocitárias obtidas por gradiente de centrifugação foram cultivadas por 48 horas em *Rosewell Park Memorial Institute* (RPMI), suplementado com Soro Bovino Fetal (SBF) 15%, penicilina 100 U/mL, estreptomicina 100 µg/mL, gentamicina 10 µg/mL e duas diferentes concentrações (45 µM e 90 µM) da fração curcuminóide obtida do extrato. Os resultados para o índice de citotoxicidade mostraram que ambas as concentrações testadas não mostraram ser citotóxicas para as células ( $p = 0,13$  e  $p = 0,72$  respectivamente). Contudo inúmeros estudos relatam ações bem definidas sobre células neoplásicas, incluindo células leucêmicas, mostrando que os curcuminóides podem ser alternativas seguras, de baixa toxicidade, para o tratamento de neoplasias.

<sup>(1)</sup> Acadêmica do curso de farmácia das Faculdades Integradas do Brasil (UNIBRASIL).

<sup>(2)</sup> Mestre em Ciências Farmacêuticas pela UFPR e docente das disciplinas de Hematologia Clínica e Bioquímica da Escola de Saúde das Faculdades Integradas do Brasil (UNIBRASIL). Rua Konrad Adenauer, 442. Curitiba-PR. jemarie@terra.com.br

## ABSTRACT

The *Curcuma longa* L., commonly known as saffron, has several distinguishing characteristics that allow its use in various fields, such as medicine. In its rhizome can find important pharmacologically active metabolites, which are classified as curcuminoids. Curcumin, its main curcuminoids, is the most studied phytochemical by its diversity of action, especially by the anticarcinogenic activity, through the induction of apoptosis, blocking of proliferation and the reduction of angiogenesis. Front of the diversity of such curcuminoids action on neoplastic cells, this work aimed to study the toxicity of curcuminoids in physiologically healthy cells. For this the crude extract from the rhizome of *Curcuma longa* L. had the separation of its compounds that have been subjected to chromatography and the product isolated with chloroform solvent was tested in the lymphocyte culture of normal cells. Lymphocyte cells obtained by gradient centrifugation were grown for 48 hours in RPMI, supplemented with SBF 15%, 100 U/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin, gentamicin 10 µg/mL and two different concentrations (45 µM and 90 µM) curcuminoids fraction obtained from the extract. The results for the cytotoxicity index revealed that both these concentrations tested showed be cytotoxic for cells ( $p = 0.13$ ,  $p = 0.72$  respectively). However numerous studies report well-defined actions on cancer cells, including leukemia cells, showing that curcuminoids may be safer alternatives, low toxicity, for the treatment of cancer.

## INTRODUÇÃO

A *Curcuma longa* L., pertencente à família das *Zingiberaceae*, é uma planta nativa da Índia e Ásia Meridional, tendo sido levada para as demais regiões do mundo pelos mercadores árabes e pelos portugueses em suas caravelas, era conhecida como açafrão e utilizada por estes povos para adicionar seu sabor característico e pigmentar aos alimentos.<sup>(1)</sup> A parte utilizada da cúrcuma é o rizoma, extensão do caule que une sucessivos brotos, sendo ele piriforme, arredondado ou ovoide, carnudo com ramificações laterais compridas dando origem à chamada “cúrcuma redonda”, apresenta um odor agradável, levemente amargo, que lembra o

gengibre, possuindo características cerosas e amareladas por fora e alaranjadas por dentro.<sup>(2)</sup>

A nomenclatura utilizada comumente é açafrão-da-Índia, sendo também citada por açafroeira, açafrão-da-terra, batatinha amarela, gengibre dourada, cúrcuma ou turmérico, do nome comum em inglês ‘*turmeric*’. A palavra cúrcuma é derivada do termo *kurkum*, designação persa para o açafrão, cultivado e apreciado desde a antiguidade em toda a bacia mediterrânea. Na África era muito utilizada pelos egípcios para pintar múmias, sendo o primeiro corante utilizado em técnicas histológicas, em 1714, por Van Leeuwenhoek. Suas diversas características possibilitaram a utilização da cúrcuma nas áreas de cosméticos (em preparações galênicas), têxtil (para tingir tecidos), de alimentos (como corante) e medicinal (como tratamento preventivo e paliativo de várias alterações metabólicas).<sup>(2)</sup>

A curcumina, um dos pigmentos curcuminóides da planta, é o mais utilizado e amplamente pesquisado, principalmente, por sua ação anticarcinogênica. Trata-se de um composto polifenólico [1,7-bis-(4-hidroxi-3-metoxifenil) -1,6-heptadieno-3,5-diona] encontrando na concentração de 2-8%, obtido a partir do rizoma da *Curcuma longa L.* e tem como principal característica organoléptica a coloração avermelhada.<sup>(3)</sup> A curcumina apresenta-se como um pó cristalino, insolúvel na água, pouco solúvel no éter, e solúvel nos álcoois metílico, etílico e ácido acético, resultando em soluções amarelas com fluorescências verdes.<sup>(4)</sup>

Além de sua propriedade corante, a curcumina possui relevante interesse devido seus efeitos benéficos no organismo humano. Existem relatos de ação em doenças biliares (diminuindo a formação de cálculos), doenças hepáticas (auxiliando a redução dos níveis de colesterol)<sup>(5)</sup> e feridas diabéticas (melhora a cicatrização). Também já foram relatadas ações anti-angiogênicas,<sup>(6)</sup> capacidade de reduzir o colesterol sanguíneo,<sup>(5)</sup> apresenta efeitos antitumorais e anti-proliferativos contra vários tumores<sup>(7)</sup> e tem propriedades anti-inflamatórias<sup>(8)</sup>. Estas variedades de ações fisiológica estão relacionadas com efeitos inibitórios da curcumina sobre diversos fatores que modulam seletivamente as vias de sinalização de múltiplas células, incluindo o fator de transcrição, NF- $\kappa$ B, as proteínas c-Myc, EGR-1,<sup>(9)</sup> COX-2,<sup>(8)</sup> proteína quinase, I- $\kappa$ B quinase,<sup>(10)</sup> o receptor TNF- $\alpha$ ,<sup>(11)</sup> receptor LDL, entre outros.

A curcumina pode também se ligar diretamente ao DNA e RNA pela sua porção de  $\beta$ -dicetona,<sup>(12)</sup> a partir desta interação ocorre à inibição da proliferação de tumores, da formação de metástases, invasão de outros tecidos, inibição da

angiogênese, além de induzir a morte celular.<sup>(13)</sup> A ação antineoplásica da curcumina, devido a estas interações direta ao material genético da célula ou modulação da expressão de alguns genes como os das proteínas citadas acima, tem sido alvo de inúmeros estudos, uma vez que a planta confere segurança farmacológica, baixo custo e ser de fácil obtenção.<sup>(6)</sup>

Ensaio clínico mostraram que a curcumina é segura mesmo quando consumida em uma dose diária de 12 g por 3 meses, além da segurança observou-se que com esta posologia houve melhoria histológica de lesões pré-cancerosas. Estes dados nos levou a estudar o efeito *in vitro* de outros curcuminóides sobre as células linfocitárias saudáveis, com o intuito de comprovar a segurança de tal composto sobre células sanguíneas.<sup>(6)</sup>

Desta forma, o objetivo deste estudo foi verificar a ação de curcuminóides frente a células linfocitárias saudáveis, para verificar a possível toxicidade da fração estudada.

## CASUÍSTICA E MÉTODO

### *Casuística*

Este trabalho foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da Liga Paranaense de Combate ao Câncer - Hospital Erasto Gaertner, em Curitiba-PR e aprovado sob parecer 2259/2013.

Participaram do estudo 3 voluntários, homens e mulheres, sabiamente sadios, com idade entre 22 a 30 anos. Foram considerados indivíduos sadios aqueles que atendessem aos critérios para doar sangue em agências transfusionais de acordo com a portaria do Ministério da Saúde n.1353 de 13 de junho de 2011.<sup>(14)</sup>

Todos os voluntários que aceitaram participaram do experimento foram convidados e assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. As amostras de sangue periférico foram coletadas no período de setembro a outubro de 2013.

### *Obtenção do extrato bruto do rizoma da Curcuma longa L.*

Foram submetidos 48,07g do material a extração com etanol absoluto em um extrator de Soxhlet. Este aparelho ficou ligado até completa extração dos compostos da planta (9 horas).

Após obtenção do extrato bruto por completo a solução foi concentrada em um evaporador rotativo (Rota-vapor) à 70°C até *secura completa* do solvente.

### *Obtenção dos curcuminóides do extrato bruto*

Ao obter o cocentrado do extrato foi feita uma pastilha com sílica gel 60 (0,05-02 mm) e fez-se uma cromatografia em coluna utilizando solventes de polaridade crescente (hexano, clorofórmio, etanol e água deionizada).

O composto isolado pertence à fração 11 cromatografado com o solvente clorofórmio.

Preparou-se uma solução de 8mg/mL, sendo o solvente utilizado dimetilsulfóxido (DMSO), e filtrada com filtro de 0,22 µm.

### *Obtenção das células*

Foram coletadas alíquotas de sangue periférico (10 mL) em heparina de indivíduos saudáveis, após consentimento informado.

### *Processamento e preparo das células para cultivo*

A separação das populações de leucócitos obtidos através das amostras coletadas foi realizada por meio de gradiente de concentração. Células mononucleares (MNC: linfócitos e monócitos) foram separadas dos granulócitos (GNC: neutrófilos, eosinófilos e basófilos) por meio de centrifugação, usando-se *Ficoll-Paque*™ PLUS 1,077g/cm<sup>3</sup> (Amersham, Biosciences).

As células leucocitárias foram centrifugadas a 800g por 25 minutos para a separação do creme leucocitário, que por sua vez foi retirado e adicionado ao PBS até 9 mL e em seguida vertido lentamente sobre 3 mL de *Ficoll-Paque*™ PLUS. Após centrifugação a 200g por trinta minutos, à temperatura ambiente, a fração de células mononucleares foi obtida.

As células mononucleares foram recuperadas da interface do gradiente e lavadas três vezes com PBS (800g/5 minutos). Uma vez isoladas as células mononucleares foram ressuspensas em meio *Rosewell Park Memorial Institute* (RPMI 1640) suplementado e a concentração ajustada para 10<sup>6</sup> células/mL, após contagem em hemocitômetro de Neubauer. Para análise de viabilidade das células utilizou-se o corante azul de Trypan em solução 0,4% (p/v) em PBS. Somente amostras contendo ≥ 90% de células viáveis foram utilizadas nos experimentos.

### *Cultivo celular*

Foram realizados cultivos com 5x10<sup>5</sup> células/mL em meio RPMI 1640 suplementado com soro bovino fetal (SBF) a 15%, penicilina 100 U/mL, estreptomicina 100 µg/mL, gentamicina 10 µg/mL e duas diferentes concentrações da fração curcuminóide obtida do extrato da *Curcuma longa* L.. As concentrações

testadas foram *aproximadamente* 45  $\mu\text{M}$  e 90  $\mu\text{M}$ , os valores são aproximados pois a concentração foi calculada conforme o valor do Mol do principal curcuminóide possivelmente presente na fração testada, a curcumina (368,37g/mol).

As células foram encubadas em placas estéreis (TPP<sup>®</sup>) de 24 poços, a temperatura de 37°C, em tensão de CO<sub>2</sub> a 5%, por 48 horas. Foram realizados 3 ensaios em duplicata para cada concentração do curcuminóide, para controle do experimento células foram cultivadas em meio RPMI 1640 suplementado apenas com SBF a 15% e os antibióticos já citados.

#### *Análise estatística*

Os resultados de cada ensaio foram apresentados como contagem média de células/mL  $\pm$  desvio padrão (DP) das duplicatas. O efeito citotóxico foi avaliado através do índice de citotoxicidade (IC) adaptado de onde a média aritmética das duplicatas dos valores obtidos por ensaio foram aplicadas como a seguir: <sup>(15)</sup>

$$IC = n^{\circ} \text{ células no teste} / n^{\circ} \text{ células no controle}$$

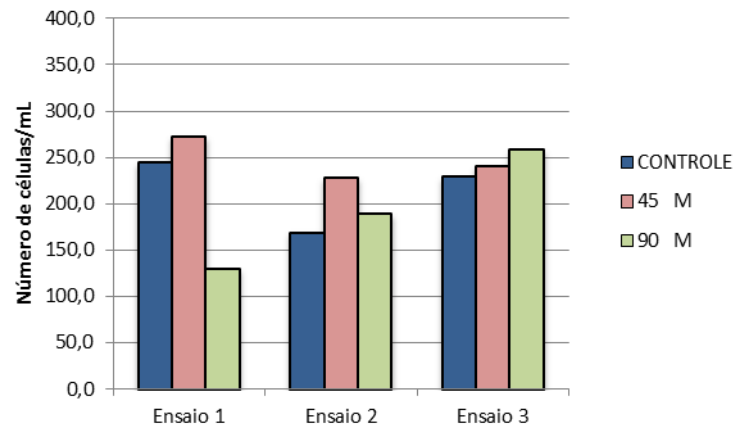
Para análise estatística dos resultados foi utilizado o teste *t*. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos.

## **RESULTADOS**

A partir da análise cromatográfica obteve-se 98 frações, separadas por diferentes grau de polaridade.

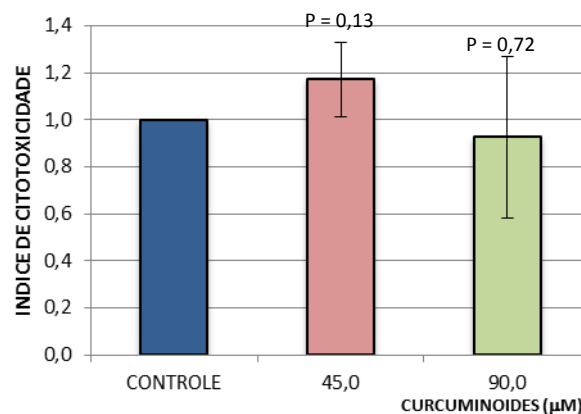
A primeira fração cromatografada foi com 100% do solvente hexano, nesta fração estava presente a porção mais apolar do extrato, contendo nela os óleos fixos com coloração amarelada fluorescente. A fração 11 foi submetida a cromatografia com 100% do solvente clorofórmio, esta fração apresentou coloração amarelada e um pó cristalino com ponto de fusão de 120°C, sendo esta fração usada no estudo pois acredita-se conter a curcumina e possivelmente outros curcuminóides. A fração 23 utilizou-se como solvente 100% do etanol e obteve-se um sólido avermelhado. Na fração 98 o solvente utilizado foi água destilada e obteve-se um pó cristalino amarelo claro.

Uma vez obtida a fração desejada, a mesma foi diluída em DMSO na concentração de 8mg/mL e testada nos cultivos celulares. A figura 2 apresenta a contagem média de células recuperadas em cada ensaio.



**Figura 2. Efeito *in vitro* da fração de curcuminóides sobre a proliferação espontânea de linfócitos humanos.** Células mononucleares obtidos de sangue periférico foram tratados com duas diferentes concentrações de curcuminóides e incubados a 37°C, por 48h em atmosfera de CO<sub>2</sub>. Cada coluna representa a média ± DP das células contadas em hemocitômetro de cada duplicata realizada em três ensaios independentes.

E a figura 3 apresenta a ação citotóxica da fração de curcuminóides nas duas concentrações testadas.



**Figura 3. Avaliação do índice de citotoxicidade *in vitro* da fração de curcuminóides sobre a proliferação espontânea de linfócitos humanos.** Células mononucleares obtidos de sangue periférico foram tratados com duas diferentes concentrações de curcuminóides e incubados a 37°C, por 48h em atmosfera de CO<sub>2</sub>. Cada coluna representa a média ± DP do índice de citotoxicidade obtido da relação entre o número de células contadas por hemocitômetro nos experimentos contendo a fração testada e o número de células obtido no controle, em três experimentos independentes realizados em duplicata. Valor de  $p > 0,05$  em relação ao controle para ambas as concentrações.

## DISCUSSÃO

A citotoxicidade das substâncias presentes em plantas, como a *Curcuma longa* L., pode ser capaz de gerar mudanças na maquinaria celular, como a vacuolização, lise celular ou de membrana por diferentes mecanismos.<sup>(17)</sup> A curcumina, curcuminóide presente no rizoma da *Curcuma longa* L., possui vários alvos moleculares que caracterizam sua citotoxicidade, como a produção excessiva

de espécies reativas de oxigênio (EROS) que leva a célula a um estresse oxidativo e apoptose, outros exemplos de mecanismos citotóxicos desenvolvidos pela curcumina são o de liberação de citocromo-c da membrana mitocondrial,<sup>(19)</sup> o bloqueio na ativação do NF- $\kappa$ B, inibição da COX-2 e supressão de p53 que também levam a uma lise celular.<sup>(21)</sup>

As principais propriedades medicinais da curcumina são atividades anti-inflamatórias, anti-proliferativas, anti-angiogênica e anti-tumorais, isso se dá através da modulação de inúmeras proteínas reguladoras, incluindo de fatores de transcrição, enzimas, citocinas e fatores de crescimento.<sup>(5)</sup>

Apesar de inúmeros efeitos fisiológicos, uma interessante observação a respeito dos curcuminóides, sobretudo da curcumina, é o fato de ser uma molécula de baixo potencial de toxicidade, tanto que há anos o produto vem sendo consumido pela sociedade como parte da sua alimentação convencional.

Os dados revelados neste trabalho confirmam a pouca ação tóxica da fração curcuminóide testada em células sanguíneas, especificamente em linfócitos. Apesar de apresentar um potencial interesse como substância antineoplásica, sobre tudo para o tratamento de neoplasias sanguíneas como as leucemias e linfomas,<sup>(7,9)</sup> os curcuminóides parecem apresentar uma interessante segurança para os demais células saudáveis do sangue.

Uma das principais vias de ação citotóxica da curcumina sobre células neoplásicas é por meio de EROS. As EROS são mediadores das vias de sinalização intracelulares e a produção exacerbada dos mesmos leva ao estresse oxidativo, o que gera uma perda da função da célula e apoptose. Os radicais livres são subprodutos da respiração celular devido a utilização do oxigênio no interior das mitocôndrias.<sup>(21)</sup> A produção de EROS leva à despolarização da membrana mitocondrial e libera moléculas pro-apoptóticas da mitocôndria para o citosol, que induz a apoptose.<sup>(17)</sup>

A curcumina, em maior concentração, é capaz de provocar apoptose, devido à produção de EROS decorrente de um rápido esgotamento de glutathiona oxidada (GSH) que aumenta os níveis espécies reativas de oxigênio e eleva a eliminação de peróxidos no citosol, bem como na mitocôndria. Por possuir esta característica a curcumina libera fatores indutores de apoptose e endonuclease no citoplasma e núcleo onde eles provocam a condensação da cromatina e fragmentação de DNA.<sup>(17)</sup>

Em células neoplásicas os níveis de glutathiona tendem a ser menor que em células normais, este fator aumenta a sensibilidade em células tumorais. Já em



células fisiologicamente normais os níveis são mais elevados o que diminui a sensibilidade, não causando esgotamento de glutathione.<sup>(20)</sup> Diferencialmente em células normais a curcumina é um antioxidante de ação direta nas EROS, sendo capaz de sequestrar radicais hidroxilas, oxigênio singlete, entre outras. A capacidade de agir com as EROS se dá pela presença de grupos fenólicos em sua estrutura.<sup>(18)</sup>

A produção excessiva de EROS em células neoplásicas pode também ocorrer devido a liberação de citocromo-c da membrana mitocondrial. O citocromo-c é um transportador de elétrons que tem como produto final oxigênio que se liga com hidrogênio para transformar-se em água. Quando há uma permeabilidade mitocondrial este ciclo é afetado gerando um acúmulo de oxigênio, esse excesso promove a morte programada. A curcumina, em baixas concentrações, induz a liberação de citocromo-c nas mitocôndrias, ocorrendo a apoptose.<sup>(19)</sup>

A p53, outro alvo da curcumina, é uma proteína supressora de tumor que também desempenha um papel central nas vias de resposta de estresse celular. O gene p53 está envolvido na resposta celular aos danos do DNA, estabilidade genômica, controle do ciclo celular e apoptose. Quando há uma supressão no gene p53, as células danificadas geneticamente além de não entrar em morte programada, aumentam sua proliferação, conseqüentemente aumentando o tumor. A curcumina, em células cancerosas, induz o gene p53 regulando negativamente a clonogenicidade e estimula a apoptose,<sup>(22)</sup> com isso induz a liberação do citocromo-c na mitocôndria.<sup>(20)</sup>

A célula estando em condições normais, encontra-se pouca proteína p53, pois ela não é pouco necessária para o desenvolvimento da célula que mantém a integridade do seu material genético normal. Sendo assim a curcumina, em células não danificadas geneticamente, não provoca a indução do gene p53 não causando a apoptose.<sup>(22)</sup>

Mais um alvo molecular da curcumina é a inibição da ciclo oxigenase-2 (COX-2). A COX é uma enzima responsável pela conversão de ácido araquidônico a prostaglandinas e tromboxanos. A COX-2 é uma enzima induzida pela prostaglandina H sintase, sua expressão é aumentada em processos inflamatórios. Sua atividade é importante na modulação do fluxo sanguíneo glomerular e balanço hidroeletrólítico. Acredita-se que a super-expressão da COX-2 está relacionado com uma grande variedade de doenças, incluindo câncer de cólon, pulmão e de mama, pois nos tecidos tumorais encontra-se uma elevada expressão de COX-2.<sup>(24)</sup>

A curcumina é capaz de inibir a COX-2,<sup>(24)</sup> este efeito é devido a inibição da sinalização da proteína IκB quinase e também impede a translocação nuclear da subunidade funcionalmente ativa da NF-κB, bloqueando a ativação do NF-κB.<sup>(25)</sup> Ao inibir a COX-2 a curcumina também impede a formação de prostaglandinas E<sub>2</sub> no tecido tumoral, prevenindo a estimulação do Fator de Crescimento do Endotélio Vascular (VEGF), este fator induz a angiogênese que estimula o crescimento da célula neoplásica.<sup>(22)</sup>

Em células não danificadas geneticamente, não há uma elevada expressão de COX-2, pois em condições fisiológicas normais não há um processo inflamatório exacerbado, deste modo a curcumina não promove a inibição desta ciclooxigenase, não apresentando toxicidade na célula normal.

O NF-κB é um fator de transcrição que atua amplamente como um regulador de genes para controle celular, proliferação e sobrevivência da célula. Esse fator existe no citoplasma em um estado inativo, porém é ativado através da fosforilação e degradação da proteína IκB quinase. A ativação do NF-κB protege as células contra apoptose, estes estímulos são ocasionados na maioria das linhas de células tumorais através da iniciação de genes de sobrevivência celular. A curcumina inibe o complexo de sinalização da proteína IκB quinase, levando a um bloqueio na ativação do NF-κB, induzindo a apoptose.<sup>(25)</sup>

A célula, em seu estado normal, apresenta o fator de transcrição NF-κB em seu estado inativo no citoplasma, por este motivo a curcumina não inibe a sinalização da proteína IκB quinase não bloqueando o NF-κB. Deste modo a célula não entra em morte programada, não sendo tóxica para células fisiologicamente saudáveis.<sup>(22)</sup>

Além de todos os mecanismos relatados, foram feitos testes fluorescente de absorção da curcumina e através métodos espectroscópicos observou-se que a absorção da curcumina é maior em células tumorais do que em células normais, isso explica, também, a baixa citotoxicidade da curcumina em células saudáveis.<sup>(20)</sup>

Ao término deste trabalho pode-se esperar que a ação da curcumina em células neoplásicas frente a células fisiologicamente saudáveis seja diferenciada. Neste trabalho verificamos que o extrato nas concentrações testadas não mostrou qualquer efeito sobre as células linfocitárias sadias, contudo inúmeros estudos relatam ações bem definidas sobre células neoplásicas, incluindo células leucêmicas. A partir de vários mecanismos, anteriormente citados, a curcumina parece causar

morte programada em células cancerosas enquanto que em células normais não apresentou qualquer citotoxicidade.

## REFERENCIAS

1. Panizza, Sylvio. Plantas que curam: cheiro de mato. 17 ed. São Paulo: IBRASA, 1997
2. Pintão AM, Silva IF. A verdade sobre o Açafrão. Workshop *Plantas Medicinais e Fitoterapêuticas nos Trópicos*. IICT /CCCM, 29, 30 e 31 de Outubro de 2008.
3. Sharma RA, Steward WP, Gescher AJ. Radiation Oncology & Biology. *Exp Adv Med Biol*. Vol.595 p.453-70, 2007.
4. Shehzad A, Wahid F, Lee YS. Curcumin in Cancer Chemoprevention: Molecular Targets, Pharmacokinetics, Bioavailability, and Clinical Trials. *Arch. Pharm. Chem. Life Sci*. Vol. 9 p. 489–499, 2010.
5. Yuan HY, Kuang SY, Zheng X. Curcumin inhibits cellular cholesterol accumulation by regulating SREBP-1/caveolin-1 signaling pathway in vascular smooth muscle cells. *Acta Pharmacol Sin*, Vol. 29 (5) p. 555–563, 2008.
6. Goel A, Kunnumakkara AB, Aggarwal BB. Curcumin as “Curecumin”: From kitchen to clinic. *Biochemical Pharmacology*, Vol. 75 p. 787-809, 2008.
7. Yu J, Peng Y, Wu CL, Xie Z, Deng Y, Hughes T, Ele S, Mo XK, Chiu M, Wang EQ, Ele X, Liu S, Grever MR, Chan KK, Liu Z. Curcumin Down-Regulates DNA Methyltransferase 1 and Plays an Anti-Leukemic Role in Acute Myeloid Leukemia. *PLoS ONE* 8(2): e55934. doi:10.1371/journal.pone.0055934, 2013.
8. Menon VP, Sudheer AR. Antioxidant and anti-inflammatory properties of curcumin. *Advances in experimental medicine and biology*. Vol. 595 p. 105-125, 2007
9. Gertsch J, Guttinger M, Heilmann J, Sticher O. Curcumin Differentially Modulates mRNA Profiles in Jurkat T and Human Peripheral Blood Mononuclear Cells. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, Vol. 11 p. 1057–1063, 2003.
10. Lin JK, Pan MH, Lin-Shiau SY. Recent studies on the biofunctions and biotransformations of curcumin. *Biofactors*. Vol. 13 p. 153–158, 2000.
11. Chan MMY. Inhibition of tumor necrosis factor by curcumin, a phytochemical. *Biochemical Pharmacology*, Vol. 49, No. 11, p. 1551-1556, 1995.
12. Gupta SC, Prasad S, Kim JH, Patchva S, Webb LJ, Priyadarsini IK, Aggarwal BB. Multitargeting by curcumin as revealed by molecular interaction studies. *Nat Prod Rep*. Vol. 28(12) p. 1937–1955, 2011.

13. Wolanin K, Magalska A, Mosieniak G, Klinger R, Mckenna S, Vejda S, Sikora E, Piwocka K. Curcumin affects components of the chromosomal passenger complex and induces mitotic catastrophe in apoptosis-resistant Bcr-Abl-expressing cells. *Mol Cancer Res.* Vol. 4(7) p.457-69, 2006.
14. Portaria nº 1353, de 13 de junho de 2011.
15. Gaines, H., L. Andersson e G. Biberfelds. A new method for measuring lymphoproliferation at the single-cell level in whole blood cultures by flow cytometry. *J Immunol Methods.* Vol. 195, p. 63-72, 1996.
16. Bhaumik S, Anjum R, Rangaraj N, Pardhasaradhi BV, Injurious Effects of Curcumin on Maturation of Mouse Oocytes, Fertilization and Fetal Development via Apoptosis. Vol. 456, p. 311–314, 2012.
17. Whang X. The expanding role of mitochondria in apoptosis. Vol. 15, p. 2922-2933, 2001.
18. Trujillo J, Chirino YI, Jijón EM, Romero ACA, Tapie, Chaverri JP, Renoprotective effect of the antioxidant curcumin: Recent findings. Vol. 1, p. 448-456, 2013.
19. Shih CM, Ko WC, Wu JS, Wei YH, Wang LF, Chang EE, Mediating of caspase-independent apoptosis by cadmium through the mitochondria-ROS pathway in MRC-5 fibroblasts. *Journal of Cellular Biochemistry,* 91, p. 384–397, 2004.
20. Ravindran J, Prasad S, Aggarwal BB. Curcumin and Cancer Cells: How Many Ways Can Curry Kill Tumor Cells Selectively?. Vol. 10, p. 1208-48, 2009.
21. Puliappadamba VT, Cheriyan VT, Thulasidasan AKT, Bava SV, Vinod BS, Prabhu PR, Varghese R, Bevin A, Venugopal S, Anto RJ, Nicotine-induced survival signaling in lung cancer cells is dependent on their p53 status while its down-regulation by curcumin is independent. Vol. 10, p. 1186, 2010.
22. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Biologia molecular da célula.* 4ª edição, p. 898-899/1343-1360, 2006
23. Plummer SM, Holloway KA, Manson MM, Munks RJL, Kaptein A, Farrow S, Howells L. Inhibition of cyclo-oxygenase 2 expression in colon cells by the chemopreventive agent curcumin involves inhibition of NF-κB activation via the NIK/IKK signalling complex. Vol. 18, N°44, p. 6013-6020, 1999.
24. Cho JW, Lee KS, Kim CW. Curcumin attenuates the expression of IL-1beta, IL-6, and TNF-alpha as well as cyclin E in TNF-alpha-treated HaCaT cells; NF-kappaB and MAPKs as potential upstream targets. Vol. 19, p. 469-74, 2007.
25. Bours V, Bentires AM, Hellin AC, Viatour P, Robe P, Delhalle S, Benoit V, Merville MP. Nuclear factor-kappa B, cancer, and apoptosis. Vol. 8, p. 1085-9, 2000.