

FERNANDA DE OLIVEIRA ARAUJO

**ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E ANTI-INFLAMATÓRIA DO GEL
TRANSDÉRMICO DE CURCUMINA EM MODELOS PARA DOENÇA
INFLAMATÓRIA INTESTINAL**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Aplicada, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

Orientadora: Marisa Alves Nogueira Diaz

Coorientadores: Leandro Licursi de Oliveira
Anésia Aparecida dos Santos
Maria do Carmo Gouveia Peluzio

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2021**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

A663a
2021

Araujo, Fernanda de Oliveira, 1986-
Atividade antioxidante e anti-inflamatória do gel
transdérmico de curcumina em modelos para doença
inflamatória intestinal / Fernanda de Oliveira Araujo. – Viçosa,
MG, 2021.
1 tese eletrônica (140 f.): il. (algumas color.).

Inclui anexo.

Orientador: Marisa Alves Nogueira Diaz.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa,
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, 2021.

Inclui bibliografia.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2022.013>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Antioxidantes. 2. Curcumina - Uso terapêutico -
Administração. 3. Intestinos - Inflamação. 4. Stress oxidativo.
I. Diaz, Marisa Alves Nogueira, 1960-. II. Universidade Federal
de Viçosa. Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular.
Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Aplicada.
III. Título.

CDD 22. ed. 613.286

Bibliotecário(a) responsável: Alice Regina Pinto CRB6 2523

FERNANDA DE OLIVEIRA ARAUJO

**ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E ANTI-INFLAMATÓRIA DO GEL
TRANSDÉRMICO DE CURCUMINA EM MODELOS PARA DOENÇA
INFLAMATÓRIA INTESTINAL**

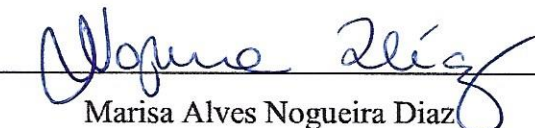
Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Aplicada, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 03 de dezembro de 2021.

Assentimento:



Fernanda de Oliveira Araujo
Autora



Marisa Alves Nogueira Diaz
Orientadora

Com amor dedico esse trabalho ao meu filho Miguel, meu noivo Cássio e aos meus pais Jorge e Maria Helena.

AGRADECIMENTOS

A Deus pelo seu amor incondicional, perdão e sabedoria infinita. À Nossa Senhora das Graças, por nunca me desamparar nos momentos mais difíceis da minha vida.

À minha orientadora Marisa Alves Nogueira Diaz, por sua acolhida, dedicação, disponibilidade para que superássemos todas as dificuldades ao longo do doutorado. Exemplo de conduta profissional e de coração ímpar, na qual levarei por toda minha vida. Obrigada pela confiança em mim demonstrada ao longo de todo esse período.

Ao meu filho amado, Miguel, que me acompanha com tanto amor desde o seu nascimento em toda a minha vida acadêmica. Obrigada por entender minha ausência e acreditar sempre nas minhas vitórias, seu sorriso é meu combustível diário para todos os trabalhos executados.

Aos meus pais, Maria Helena de Oliveira Araujo e Jorge Luis Araujo, por serem meus exemplos, meus conselheiros, minha força e meu descanso. Agradeço pela doação e pelo amor incondicional, sem o apoio e amor de vocês eu não conseguiria chegar até aqui.

Ao meu amor, Cássio Furtado Lima, que me apoiou em todas as etapas do doutorado e na aprovação dos concursos. Obrigada por acreditar sempre em mim, me olhar com amor em todas as situações, ser meu fiel companheiro, alegre, bondoso e amoroso.

À minha irmã Poliana, meu cunhado Henrique, meu afilhado Théo e aos meus sogros Fátima e Francisco, por constituírem a essa amada instituição, que tanto prezo, a mais importante para mim: Família!

À minha coorientadora Maria do Carmo Gouveia Peluzio, exemplo de comprometimento e dedicação. Obrigada por me auxiliar desde a graduação até o doutorado e não medir esforços para que eu alcançasse meus objetivos.

Aos meus coorientadores, Leandro Licursi de Oliveira e Anésia Aparecida dos Santos pela disponibilidade de tempo dedicado a mim. Obrigada por serem fundamentais para o meu conhecimento da pesquisa científica.

Às professoras, Virgínia Ramos Pizziolo e a professora Eliana Carla Gomes de Souza sempre atenciosas. Obrigada por estarem sempre disponível a me ajudar.

Ao Matheus, companheiro dos experimentos. Obrigada pela confiança, paciência e aceitar todos os desafios juntos, sempre me encorajando, sem deixar que eu desanimasse e por estar sempre disposto a ajudar e compartilhar seus conhecimentos.

Aos colegas do Laboratório BioNat, pelas ajudas e companheirismo em todo esse período.

Aos colegas de trabalho do Departamento de Biologia Animal, Luís Ótávio, Daniel e Alessandra e Raul pela disponibilidade, seriedade e competência na parceria das análises histológicas e do estresse oxidativo.

Ao Técnico Juliano do Biotério Central da UFV, por ser sempre prestativo em ajudar e cuidar com tanto cuidado dos todos os animais utilizados nos estudos experimentais.

Ao Departamento de Bioquímica Aplicada, pelo suporte e apoio em todas as etapas do trabalho, em especial o Professor Cláudio Mafra e o secretario da pós-graduação, Eduardo.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para que o presente trabalho se tornasse realidade.

“Não fui eu que lhe ordenei? Seja forte e corajoso! Não se apavore, nem desanime, pois, o Senhor, o seu Deus, estará com você por onde você andar. Somente seja forte e corajoso.”

Josué, 1:9

RESUMO

ARAÚJO, Fernanda Oliveira, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, dezembro de 2021. **Atividade antioxidante e anti-inflamatória do gel transdérmico de curcumina em modelos para doença inflamatória intestinal.** Orientadora: Marisa Alves Nogueira Díaz. Coorientadores: Anésia Aparecida dos Santos, Leandro Licursi de Oliveira e Maria do Carmo Gouveia Peluzio.

Doenças Inflamatórias Intestinais (DII) é um grupo de doenças inflamatórias que acometem o trato gastrointestinal. Podem ocorrer por meio de duas formas principais, a Doença de Crohn (DC) e a Colite Ulcerativa (CU). O Brasil ainda possui baixa prevalência destas doenças. Contudo, a incidência vem aumentando anualmente. Muitos pacientes não têm resposta para as terapias ou tem uma resposta que não é sustentada. Opções adicionais de tratamento com novos mecanismos de ação são necessários para aumentar taxas de eficácia. As plantas constituem uma fonte natural de compostos bioativos eficazes que podem ser utilizados em diversas aplicações, principalmente como aditivos alimentares e na promoção da saúde como ingredientes na formulação de fitoterápicos e nutracêuticos. A espécie *Curcuma longa* tem demonstrado possuir uma diversidade de compostos fenólicos, sendo o principal a curcumina, que podem proteger o corpo do processo oxidativo e efeito protetor e preventivo contra várias doenças. Os produtos naturais com propriedades anti-inflamatórias, como a curcumina, possibilitam a mesma ação proposta pelos medicamentos alopáticos, porém com menores efeitos adversos. Pesquisas recentes indicaram que a curcumina pode atenuar a DII, melhorando assim a função da barreira intestinal, modulando várias vias de sinalização celular, produzindo efeitos antiinflamatórios, antioxidantes e imunomoduladores. Um possível entrave para o uso oral é a sua pouca solubilidade e permeabilidade. Torna-se importante o desenvolvimento de formulações com curcumina para melhorar biodisponibilidade desse composto. O objetivo deste estudo é avaliar o efeito do gel transdérmico de curcumina (CTG), com diferentes concentrações, sobre o estresse oxidativo e a inflamação intestinal em camundongos *knockout* para IL-10 (IL-10 KO). Além disso a capacidade antioxidante da curcumina *in vitro* foi avaliada através de macrófagos murinos RAW 264. Foram realizadas *in vitro* os ensaios de determinação da atividade antioxidante por DPPH, o ensaio de viabilidade celular, a avaliação da viabilidade celular após indução ao estresse oxidativo com H₂O₂ e a avaliação da capacidade citoprotetora da curcumina. *In vivo*, foram utilizados um total de 52 camundongos fêmeas IL10^{-/-} da espécie *Mus musculus*. Todos os animais estavam em sua 10^a semana de vida. O estudo foi dividido em

duas etapas. Na primeira etapa: um grupo controle (CN, n= 8) e três tratamentos de gel transdérmico de curcumina (C50: 50mg, n=3), (C75: 75mg, n=3) e (C100: 100mg, n=3) por quilograma de peso corporal. E na segunda etapa: grupo controle (CN, n= 5) e três tratamentos de gel transdérmico de curcumina (C100: 100mg, n=5), (C200: 200mg, n=5) e (C400: 100mg, n=5) por quilograma de peso corporal. O gel transdérmico foi obtido a partir da incorporação da curcumina ao pentravan[®]. Os animais foram tricotizados na parte dorsal e receberam GTC de diferentes concentrações diariamente. Os resultados obtidos na primeira parte do experimento, demonstraram que as concentrações de malondialdeído do cólon foram menores nos tratamentos C50 e C75. No intestino delgado e cólon, a catalase reduziu em ambos os órgãos e a superóxido dismutase reduziu apenas no cólon, aumentando no intestino delgado nos tratamentos C50 e C75. A glutatona transferase aumentou no intestino delgado no grupo C75 e diminuiu no cólon. Na segunda etapa do experimento, o GTC foi capaz de reduzir, no intestino delgado, as atividades da SOD e CAT, e aumentar as atividades de GST no grupo C200. No cólon, tivemos maior concentração das moléculas antioxidantes GST e ON no grupo C400. Na histologia, o GTC aumentou a camada muscular, no intestino delgado de todos os animais tratados, no cólon nos animais C100 e C200, e no ceco nos animais C100. No intestino delgado o GTC preservou a integridade do epitélio na vilosidade no C200. No ceco, o GTC aumentou a profundidade da cripta nos grupos C200 e C400. Todos os dados do estudo foram submetidos à análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste *post hoc* Tukey (os dados *in vitro*) e Newman Keuls (os dados *in vivo*) ambos a 5% de probabilidade. As análises estatísticas foram realizadas no programa GraphPad Prism versão 6.01. O presente estudo demonstrou que o CTG tem um efeito protetor sobre o estresse oxidativo e a melhora histológica de camundongos nocaute de IL-10, e pode desempenhar um papel significativo no tratamento de doenças inflamatórias intestinais no futuro, particularmente como terapia adjuvante.

Palavras-chave: Inflamação intestinal. Estresse oxidativo. Curcumina. Antioxidantes. Gel transdérmico.

ABSTRACT

ARAUJO, Fernanda Oliveira, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, December 2021. **Antioxidant and anti-inflammatory activity of curcumin transdermal gel in models for inflammatory bowel disease.** Advisor: Marisa Alves Nogueira Díaz. Co-advisers: Anésia Aparecida dos Santos, Leandro Licursi de Oliveira and Maria do Carmo Gouveia Peluzio.

Inflammatory Bowel Diseases (IBD) is a group of inflammatory diseases that affect the gastrointestinal tract. They can occur through two main forms, Crohn's Disease (CD) and Ulcerative Colitis (UC). Brazil still has a low prevalence of these diseases. However, the incidence is increasing annually. Many patients do not respond to therapies or have a response that is not sustained. Additional treatment options with new mechanisms of action are needed to increase efficacy rates. Plants are a natural source of effective bioactive compounds that can be used in various applications, mainly as food additives and in health promotion as ingredients in the formulation of herbal medicines and nutraceuticals. The species *Curcuma longa* has been shown to have a variety of phenolic compounds, the main one being curcumin, which can protect the body from the oxidative process and have a protective and preventive effect against various diseases. Natural products with anti-inflammatory properties, such as curcumin, allow the same action proposed by allopathic medicines, but with fewer adverse effects. Recent research has indicated that curcumin can attenuate IBD, thus improving intestinal barrier function, modulating various cell signaling pathways, producing anti-inflammatory, antioxidant and immunomodulatory effects. A possible obstacle for oral use is its poor solubility and permeability. It is important to develop formulations with curcumin to improve the bioavailability of this compound. The aim of this study is to evaluate the effect of transdermal curcumin gel (CTG), with different concentrations, on oxidative stress and intestinal inflammation in IL-10 knockout mice. In addition, the antioxidant capacity of curcumin in vitro was evaluated using RAW 264 murine macrophages. In vitro assays for determination of antioxidant activity by DPPH, cell viability assay, evaluation of cell viability after induction of oxidative stress with H₂O₂ were performed. and the assessment of the cytoprotective capacity of curcumin. In vivo, a total of 52 female IL10 ^{-/-} mice of the *Mus musculus* species were used. All animals were in their 10th week of life. The study was divided into two stages. In the first step: a control group (CN, n=8) and three treatments of transdermal curcumin gel (C50: 50mg, n=3), (C75: 75mg, n=3) and (C100: 100mg, n=3) per kilogram of body weight. And in the second stage: control group (CN, n=5) and three treatments of transdermal curcumin gel (C100:

100mg, n=5), (C200: 200mg, n=5) and (C400: 100mg, n=5) per kilogram of body weight. The transdermal gel was obtained from the incorporation of curcumin to pentravan®. The animals were trichomized in the dorsal part and received GTC of different concentrations daily. The results obtained in the first part of the experiment, demonstrated that the concentrations of malondialdehyde in the colon were lower in treatments C50 and C75. In the small intestine and colon, catalase was reduced in both organs and superoxide dismutase was reduced only in the colon, increasing in the small intestine in treatments C50 and C75. Glutathione transferase increased in the small intestine in the C75 group and decreased in the colon. In the second stage of the experiment, the GTC was able to reduce, in the small intestine, the activities of SOD and CAT, and increase the activities of GST in the C200 group. In the colon, we had a higher concentration of the antioxidant molecules GST and ON group C400. Histologically, GTC increased the muscle layer in the small intestine of all treated animals, in the colon in C100 and C200 animals, and in the cecum in C100 animals. In the small intestine, GTC preserved the integrity of the epithelium in the villi at C200. In the cecum, GTC increased the depth of the crypt in the C200 and C400 groups. All study data were subjected to analysis of variance (ANOVA) followed by post hoc Tukey (in vitro data) and Newman Keuls (in vivo data) tests, both at 5% probability. Statistical analyzes were performed using GraphPad Prism version 6.01. The present study demonstrated that CTG has a protective effect on oxidative stress and histological improvement in IL-10 knockout mice and, may play a significant role in the treatment of inflammatory bowel disease in the future, particularly as adjuvant therapy.

Keywords: Intestinal inflammation. Oxidative stress. Curcumin. Antioxidates. Transdermal gel.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AP-1	Proteína Ativadora 1
AGCC	Ácidos graxos de cadeia curta
AMPs	Peptídeos antimicrobiano
APCs	Célula apresentadora de antígeno
BSA	Albumina sérica bovina
CAT	Catalase
CU	Colite Ulcerativa
COX-2	Ciclooxigenase-2
DCNT	Doenças crônicas não transmissíveis
DC	Doença de Crohn
DCC	Derivado de curcumina
DMEM	Dulbecco modification of Minimum Essential Media
DMSO	Dimetilsulfóxido
DII	Doença inflamatória intestinal
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazil
EHC	Extrato hexânico de curcumina
ERN's	Espécies reativas de nitrogênio
ERO's	Espécies reativas de oxigênio
FT	Fator de transcrição
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
GPx	Glutaciona peroxidase
GST	Glutaciona S- transferase
GSH	Glutaciona reduzida
GTC	Gel transdérmico de curcumina
HE	Hematoxilina e Eosina
H₂O₂	Peróxido de hidrogênio
HO-1	Hemo oxigenasse
HSP-72	Proteína do choque térmico
IκB	Fator nuclear do gene do polipeptídeo kappa light potenciador no inibidor de células B

Ikk	IκB quinase
IL-	Interleucina
IL-10 KO	Nocaut de interleucina 10
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial
iNOS	Óxido nítrico sintase indutível
INF-γ	Interferon gama
JNK	c-Jun N-terminal Quinase
LPL	Lipoproteína lipase
LPS	Lipopolissacarídeos
MAPK	Proteína cinase ativada por mitogénio
MCP-1	Proteína quimioatrativa para monócitos -1
MDA	Malondialdeído
MPO	Mieloperoxidase
NF-κB	Fator de transcrição nuclear kappa B
NRF2	Fator relacionado ao TNFα
NOD1	Proteína 1 receptora do tipo NOD que reconhecem componentes microbianos
NOD1	Proteína 2 receptoras do tipo NOD que reconhece componentes microbianos.
NOXs	NADPH oxidases
PAMP	Padrão Molecular Associado a Patógenos
PC	Proteína Carbonilada
RT-qPCR	Transcrição Reversa associada à Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa em Tempo Real
SOD	Superóxido dismutase
TAG	Triacilglicerol
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TGF-β	Fator de transformação do crescimento beta
TGI	Trato gastrointestinal
TH1	Células auxiliaadoras do tipo 1
TH2	Células auxiliaadoras do tipo 2
TLR4	Receptor 4 do tipo <i>toll-like</i>
TNF	Fator de necrose tumoral

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	16
2. OBJETIVOS	20
2.1. Objetivo geral	20
2.2. Objetivos específicos	20
3. REFERENCIAL TEÓRICO	21
3.1. Morfologia do Intestino	21
3.2. Doença Inflamatória Intestinal (DII)	22
3.3. Inflamação Intestinal e o Mecanismo de Sinalização Molecular	29
3.4. Estresse oxidativo e inflamação intestinal	31
3.4.1. Peroxidação de lipídios	35
3.5. Terapia farmacológica e não-farmacológica	36
3.6. Compostos bioativos e a inflamação intestinal	38
3.7. Açafrão da Terra (<i>Curcuma longa</i>)	40
3.8. Via transdérmica	44
4. JUSTIFICATIVA	46
5. MATERIAIS E MÉTODOS	47
5.1. Preparo do gel transdérmico de curcumina (GTC)	47
5.2. Local de execução	48
5.3. Cultivo celular dos macrófagos	48
5.4. Atividade sequestradora do radical 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH•)	48
5.4.1. Inibição da desnaturação da albumina	49
5.4.2. Ensaio de viabilidade celular	49
5.4.3. Avaliação da viabilidade celular após indução ao estresse oxidativo com H ₂ O ₂ ..	50
5.4.4. Avaliação da capacidade citoprotetora dos compostos in vitro	50
5.5. Ensaio biológico <i>in vivo</i>	51
5.5.1. Animais	51
5.5.2 Grupos experimentais	52
5.6. Eutanásia dos animais	54
5.7. Preparação do homogeneizado para análise dos marcadores do estresse oxidativo e da defesa antioxidante no tecido intestinal	54
5.8. Concentração de malondialdeído (MDA)	54
5.9. Atividade da superóxido dismutase (<i>SOD</i>)	55
5.10. Atividade da catalase (<i>CAT</i>)	55
5.11. Glutathione Transferase (<i>GST</i>)	56
5.12. Análises histomorfométricas do intestino, colón e ceco	56
6. ANÁLISES ESTATÍSTICAS	58
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59
ARTIGO 1	71

ANTIOXIDANT AND ANTI-INFLAMMATORY ACTIVITY OF CURCUMIN TRANSDERMAL GEL IN AN IL-10 KNOCKOUT MOUSE MODEL OF INFLAMMATORY BOWEL DISEASE.....	71
ABSTRACT	72
1. INTRODUCTION.....	73
2. MATERIALS AND METHODS	75
2.1. Preparation of curcumin transdermal gel.....	75
2.2. Animals.....	75
2.3. Experimental design	76
2.4. Preparation of intestine homogenates for analysis of oxidative stress and antioxidant defense markers	76
2.5. Malondialdehyde (MDA) concentration.....	76
2.6. SOD activity	77
2.7. CAT activity	77
2.8. GST activity.....	77
2.9. Histomorphometric analysis of the small intestine, colon, and cecum.....	77
2.10. Statistical analysis.....	77
3. RESULTS.....	78
3.1. Effect of curcumin transdermal gel on body weight.....	78
3.2. Effect of curcumin transdermal gel on oxidative stress.....	79
3.3. Effect of curcumin transdermal gel on the small intestine, colon, and cecum	80
4. DISCUSSION.....	83
5. CONCLUSION	86
6. REFERENCES	86
ARTIGO 2.....	93
AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA FORMULAÇÃO DE CURCUMINA EM GEL TRANSDÉRMICO <i>IN VITRO</i> QUANTO A VIABILIDADE, CAPACIDADE CITOPROTETORA, ANTIOXIDATIVA E DE PROTEÇÃO <i>IN VIVO</i> DA MORFOLOGIA INTESTINAL.....	93
ABSTRACT	93
1. INTRODUÇÃO.....	95
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	97
2.1. Determinação da atividade antioxidante por DPPH	97
2.2. Ensaio de viabilidade celular.....	97
2.3. Avaliação da viabilidade celular após indução ao estresse oxidativo com H ₂ O ₂	98
2.4. Avaliação da capacidade citoprotetora da curcumina <i>in vitro</i>	98
2.5. Preparo do gel transdérmico de curcumina (GTC) para ensaio biológico <i>in vivo</i>	98
2.6. Ensaio Biológico <i>in vivo</i>	99
2.6.1. Animais/Desenho experimental	99
2.7. Medidas biométricas	100
2.8. Análise dos níveis de peroxidação lipídica e estresse oxidativo.....	100
2.8.1. Preparo do homogeneizado	100
2.8.2. Concentração de malondialdeído (MDA)	100
2.8.3. Concentração de Nitrito	100
2.8.4. Atividade da superóxido dismutase (SOD).....	101

2.8.5. Atividade da catalase (CAT)	101
2.8.6 Atividade da Glutathione Transferase (GST)	101
2.9. Análises histomorfométricas do intestino, colón e ceco	101
2.10. Análises estatísticas	102
3. RESULTADOS	102
3.1. Atividade antioxidante da curcumina <i>in vitro</i>	102
3.2. Viabilidade celular de macrófagos da linhagem RAW 264.7 após tratamento com curcumina.....	104
3.3. Atividade antioxidante da curcumina em células de macrófago RAW 264.7	105
3.4. Estudo in vivo - Efeito do gel transdérmico de curcumina (GTC) nas medidas biométricas	106
3.5. Efeito do GTC na peroxidação lipídica e nas enzimas envolvidas no estresse oxidativo	107
3.6. Efeito do gel transdérmico de curcumina no tecido do intestino delgado, cólon e ceco em camundongos IL-10KO com inflamação intestinal	110
4. DISCUSSÃO	112
5. CONCLUSÃO	117
6. REFERENCIAS	117
ARTIGO 3	124
THE CURCUMIN POTENTIAL: A REVIEW OF THE CHARACTERIZATION, FUNCTION AND MECHANISM OF ACTION IN INFLAMMATORY BOWEL DISEASE	124
ABSTRACT	124
1. INTRODUCTION	125
2. CURCUMIN.....	126
2.1. Curcumin and Intestinal Inflammation: Mechanisms of action.....	129
3. CONCLUSIONS	133
4. REFERENCES	134
CONCLUSÃO GERAL	139
ANEXO A - Aprovação do projeto pelo Comitê de Ética no Uso de Animais – CEUA/UFV	140

1. INTRODUÇÃO GERAL

Doença Inflamatória Intestinal (DII) é um grupo de doenças inflamatórias que acometem o trato gastrointestinal. Podem ocorrer por meio de duas formas principais, a Doença de Crohn (DC) e a Colite Ulcerativa (CU). Ambas as doenças são de etiologia ainda pouco conhecida. Acredita-se que fatores ambientais, genéticos, microbiológicos e imunológicos estejam envolvidos na progressão e manutenção dessas doenças. Os sinais e sintomas clínicos da DII incluem dor abdominal, fadiga, diarreia muco-sanguinolenta, perda de peso, a má nutrição além de várias manifestações extra-intestinais (GRAHAM & XAVIER, 2020; VASOVIC et al., 2016; AKIHO et al., 2015; MARANHÃO; VIEIRA; CAMPOS, 2015; ROSA; SILVAJUNIOR; ROSA, 2014). O aumento da incidência e a prevalência da DII no mundo estão relacionados com o estilo de vida moderno, com o consumo de alimentos ultraprocessados e com o estresse. O Brasil ainda possui baixa prevalência da doença. Contudo, a incidência vem aumentando anualmente (SANTOS et al., 2015).

Na DII temos duas importantes vias que são responsáveis pela primeira resposta inflamatória. São elas: as vias NF-kB e AP-1/MAPK. O NF-kB e AP-1 são fatores de transcrição ubíquos que se ligam ao DNA para regular a expressão gênica de genes inflamatórios, diferenciadores, proliferativos e apoptóticos. Assim, como resposta celular a via do NF-kB, o sistema imune aumenta a produção de citocinas pró-inflamatórias como fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), Interferon-gama (INF- γ), Interleucina (IL) -12, IL-1 β , IL-6, IL-13 e IL-17 que agirão como os efetores no processo inflamatório característico das DII (NEURATH et al., 2014). O NF-kB provavelmente é o fator de transcrição dominante envolvido em doenças inflamatórias intestinais (BURGE et al., 2019; DE PLAEN et al., 2007). Na patogênese da DII, as citocinas desempenham papel importante ao controlar múltiplos aspectos da resposta inflamatória. Em particular, o desequilíbrio entre citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias que ocorre na DII impede a resolução da inflamação e, em vez disso, leva à perpetuação da doença e à destruição tecidual (NEURATH et al., 2014).

Em nossas células existem fatores de transcrição (FT) gênica sensíveis a sinais extracelulares e, ou modificações no meio interno capazes de regular a expressão dos genes, gerando respostas aos estímulos. Dentre estes, estão o NF-kB e a AP-1 (proteína ativadora 1). Os FT podem ser modulados pelo estresse oxidativo e agentes inflamatórios e antiinflamatórios. O estresse oxidativo, via sinalização dos FT e lesão celular, gera modificações gênicas no núcleo das células, agindo como um potente indutor da resposta inflamatória, por alterar a

síntese de citocinas, prostaglandinas, tromboxano, leucotrienos, moléculas de adesão e quimiocinas (HADDAD, 2002; RAUHMANN & MACNEE, 2000; JASSEN-HEINIGER; POYNTER & BAEURLE, 2000).

As células inflamatórias ativadas durante o processo da doença inflamatória intestinal, causa dano oxidativo aos constituintes celulares, incluindo lipídios, levando a lesões adicionais da mucosa, disfunção e agravamento da inflamação que intensificam mais o processo patológico. Nesse contexto, produtos de peroxidação lipídica, induzem a infiltração e ativação da inflamação da célula (TREVISANI et al., 2007).

Um mecanismo proposto como subjacente à fisiopatologia da DII é o desequilíbrio redox, que está envolvido na patogênese e progressão de distintas doenças que tem como característica em comum a inflamação crônica, incluindo as doenças neurodegenerativas, o câncer e as cardiovasculares (DCNT) (SOARES et al., 2015; ZHU & LI, 2012). Esse desequilíbrio está relacionado com o aparecimento de sinais e sintomas da DII, incluindo diarreia, megacólon tóxico e dor abdominal (DAMIANI, 2006; BARBOSA et al., 2010). Antioxidantes de origem endógena, como as enzimas superóxido dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx) e s-transferase (GST) e catalase, são capazes de combater o estresse oxidativo na mucosa intestinal. Toda via, o processo inflamatório requer um aumento da demanda por estes importantes antioxidantes, resposta que, nem sempre, é atendida. Como resultado, gera-se uma desigualdade entre os fatores pró-oxidantes e antioxidantes, resultando assim em lesões no epitélio intestinal (TORRES et al., 2011; MANDALARI et al., 2011; MOURA et al., 2015).

Com o objetivo de combater o estresse oxidativo e preservar a homeostase, é necessária a produção endógena de antioxidantes e adquirir antioxidantes exógenos, dietéticos. Antioxidantes endógenos consiste na produção enzimática de por exemplo: SOD), CAT e GPx. Antioxidantes dietéticos incluem vitamina E (tocoferóis e tocotrienóis), ácido ascórbico (vitamina C), ubiquinona (coenzima Q10), tióis (ácido alfa-lipóico), carotenoides e flavonoides (STROBEL et al., 2011). Assim, os compostos bioativos, antioxidantes, presentes nos alimentos em doses ideais, podem exercer os seus efeitos benéficos, influenciando na expressão gênica de genes envolvidos na sinalização intracelular anti-inflamatória e no combate do processo inflamatório sistêmico (DRAGANO et al., 2013).

A espécie *Curcuma longa* tem demonstrado possuir uma diversidade de compostos fenólicos. O principal composto já conhecido na literatura é a curcumina, esta apresenta funções antioxidante, antimicrobiano, anti-inflamatório, antiangiogénico, antimutagénico, propriedades de agregação antiplaquetária, efeito protetor, preventivo e terapêutico benéficos em várias

doenças, incluindo doenças inflamatórias, doenças neurológicas, doenças cardiovasculares, doenças pulmonares, doenças metabólicas, doenças hepáticas e cânceres e distúrbios dermatológicos (ZAHEDIPOUR et al., 2020; SADEGHI, et al., 2018; BETÜL KOCAADAM & NEVİN ŞANLIER, 2015; DEOGADE E GHATE, 2015; DEVASSY et al., 2015; PRASAD et al., 2014, KLOESCH et al., 2013).

Nas últimas décadas, investigações experimentais revelou o potencial terapêutico da curcumina contra um amplo espectro de doenças inflamatórias, incluindo a DII. Além disso, foi relatado que a curcumina interage diretamente com muitos mediadores de sinalização implicados na patogênese da DII (ZAHEDIPOUR et al., 2020; VECCHI et al., 2014).

A busca de agentes dietéticos disponíveis, baratos e multidirecionados ou compostos naturais, antioxidantes, que venham a desempenhar papel fundamental no tratamento da DII é de grande interesse de muitos estudos, pois existe a possibilidade de aumentar a qualidade e vida dos pacientes, diminuindo assim o custo dos tratamentos e os efeitos colaterais dos medicamentos convencionais.(FALLAHI et al., 2021; VECCHI et al., 2014).

A tolerabilidade e segurança da curcumina foram confirmadas em ensaio clínico em seres humanos e em cobaias para tratamento de vários distúrbios inflamatórios. No entanto a principal limitação do seu uso clínico está na sua baixa biodisponibilidade oral, devido a má absorção no intestino. A curcumina é hidrofóbica sendo pouco solúvel em água, seu coeficiente partição octanol/água é de aproximadamente 3,3. Além disso apresenta alta taxa de metabolismo, o que resulta em um curto tempo de meia-vida (OHNO et al., 2017).

Apesar dos promissores efeitos biológicos da curcumina, sua pobre biodisponibilidade oral em roedores e humanos restringiu seu uso no controle de doenças humanas. É bem conhecido que muitos fármacos apresentam problemas de biodisponibilidade devido à sua baixa solubilidade em água, taxa de dissolução lenta e instabilidade no trato gastrointestinal. Uma absorção oral deficiente devido à sua extremamente baixa solubilidade aquosa ou extenso metabolismo pré-sistêmico pode ser responsável pela farmacocinética desfavorável desta molécula. Em roedores, a curcumina sofre metabolismo ávido por conjugação e redução e a sua absorção após a administração oral é caracterizada por uma baixa biodisponibilidade sistêmica (FALLAHI et al., 2021;YADAV el al., 2009).

Neste estudo desenvolveu-seuma formulação trasdérmica de curcumina. A curcumina pode desempenhar um papel significativo no tratamento da doença inflamatória intestinal no futuro, particularmente como terapia adjuvante à saúde devido às suas propriedades antioxidantes e anti-inflamatória, melhorando o estresse oxidativo, e conseqüentemente o

processo inflamatório intestinal da DII. O desenvolvimento do géł trasdémico de curcumina, é uma alternativa de via que oferece melhor bem-estar ao paciente substituindo a via oral e para aumento da biodisponibilidade do composto.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

O objetivo do estudo foi avaliar o efeito do gel transdérmico de curcumina no estresse oxidativo e na inflamação em modelo animal para doença inflamatória intestinal.

2.2. Objetivos específicos

- ✓ Avaliar o potencial antioxidante da curcumina *in vitro*
- ✓ Elaborar um gel transdérmico de curcumina com diferentes concentrações com propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias.
- ✓ Verificar se o gel transdérmico de diferentes concentrações é capaz de tratar a inflamação intestinal em camundongos nocaute de IL-10 (IL-10 KO);
- ✓ Medir a peroxidação de lipídios, e a defesa antioxidante no intestino delgado, cólon e ceco de camundongos IL-10 KO;
- ✓ Avaliar o efeito do gel transdérmico na melhoria da morfologia do intestino, cólon e ceco dos camundongos IL-10 KO;

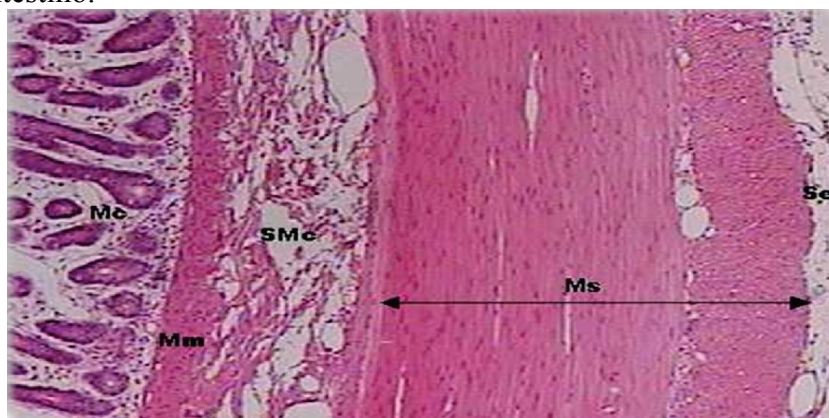
3. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1. Morfologia do Intestino

O intestino consiste em duas porções principais: intestino delgado, dividido em duodeno, jejuno e íleo responsável pela digestão e absorção de nutrientes e o intestino grosso, dividido em ceco, cólon e reto é responsável pela absorção de água e formação de fezes. O intestino delgado possui sua parede organizada em camadas ou túnicas, sendo que a partir do lúmen intestinal encontram-se as túnicas mucosa, submucosa, muscular externa e serosa (Figura 1) (TOMASELLO et al., 2016).

A mucosa apresenta especializações que aumentam significativamente sua área de superfície formando as vilosidades, projeções digitiformes da mucosa voltadas para o lúmen. Destacam que essas estruturas são revestidas por epitélio simples cilindro, formado por enterócitos, células caliciformes, células enteroendócrinas, células de Paneth e células-tronco. Parte dessas células se concentra nas criptas intestinais que se estendem até a camada muscular da mucosa. As criptas intestinais são glândulas tubulares simples encontradas entre as vilosidades da parede do intestino delgado e intestino grosso (colon). Secretam diversas enzimas e possuem células especializadas na produção de hormônios e enzimas de defesa. As vilosidades e as criptas caracterizam a mucosa do intestino delgado (TOMASELLO et al., 2016; CAMBUI & NATALI, 2015).

Figura 1: Fotomicrografia do intestino delgado (duodeno) evidenciando a túnica mucosa (Mc), a camada muscular da mucosa (Mm), a túnica submucosa (SMc), a túnica muscular externa (Ms) formada de duas camadas de músculo liso e a túnica serosa (Se) de tecido conjuntivo revestido por células mesoteliais, as quais estão voltadas para a cavidade peritonial que envolvem o intestino.



Fonte: Cambui & Natali, 2016.

O epitélio do intestino grosso compreende colonócitos semelhantes aos enterócitos. No entanto tem como principal função a de absorver a água. Colonócitos são organizados para formar ao longo de células caliciformes, glândulas tubulares simples que secretam muco neutro para lubrificar o conteúdo intestinal. A túnica mucosa do intestino grosso caracteriza-se pela ausência de vilos, observa-se-se que é constituído por epitélio simples cilíndrico, com células caliciformes, sobre uma lâmina própria de tecido conjuntivo similar àquele visto no intestino delgado, é responsável pelo revestimento das criptas intestinais e acrescentam que o número de células caliciformes em relação aos enterócitos é maior no colo que no intestino delgado com aumento desta proporção em direção à região do ceco e reto. Ressalta-se que que as criptas contêm células-tronco para a renovação do epitélio, além de células enteroendócrinas (JUNQUEIRA E CARNEIRO, 2008).

3.2. Doença Inflamatória Intestinal (DII)

A doença inflamatória intestinal (DII) afeta pessoas em todo o mundo. A incidência e prevalência mundial é crescente, com as maiores taxas nas nações ocidentalizadas, especialmente no Reino Unido e na América do Norte. Atinge da mesma forma homens e mulheres, mas varia com a etnia (JIMENEZ & GASCHE, 2019; ALGIERI et al., 2014; LOFTUS, 2004). São comumente detectados em jovens entre 18 e 25 anos de idade e, até o momento, é incurável (RETNAKUMAR & MULLER, 2019). Considerando que a DII afeta principalmente os jovens e adultos e podem levar a incapacidade e, até contribuir para a morbidade à longo prazo além de causar problemas sociais, psicológicos e econômicos, esta vêm obtendo maior atenção e são consideradas um problema de saúde pública em alguns países (BARROS; SILVA; NETO, 2014).

No Brasil, poucos estudos analisam os aspectos epidemiológicos da DII, sendo que a maioria apenas descreve os aspectos clínicos e a frequência de admissão em hospitais, devido essa enfermidade não ter qualquer tipo de referência quanto à incidência ou prevalência na população (RETNAKUMAR & MULLER, 2019). Várias linhas de evidência sugerem que a doença é causada por uma confluência de fatores genéticos e ambientais que alteram a homeostase intestinal, desencadeando assim a inflamação imunomediada em indivíduos geneticamente suscetíveis (CARUSO & NÚÑEZ, 2020).

A DII (Figura 2) é um grupo de desordens inflamatórias recorrente que afeta o intestino delgado. Os dois tipos mais comuns de DII são a doença de Crohn (DC) e colite ulcerosa (CU),

que se caracterizam por inflamação intestinal não controlada, exacerbada que contribui para o agravamento da qualidade de vida dos doentes (DONG et al.,2019; ALGIERI et al., 2014). A prevalência é maior na doença de Crohn quando comparada colite ulcerativa (JIMENEZ & GASCHE, 2019). Pacientes com CU e DC, enfrentam um risco aumentado de desenvolver câncer colorretal. As evidências, principalmente da colite ulcerosa, sugerem que as mutações no *TP53* representam uma etapa inicial na progressão do epitélio colônico inflamado para o câncer colorretal. No entanto, as vias envolvidas na evolução do câncer de cólon em pacientes com DC ainda são mal caracterizadas (HIRSCH et al., 2018).

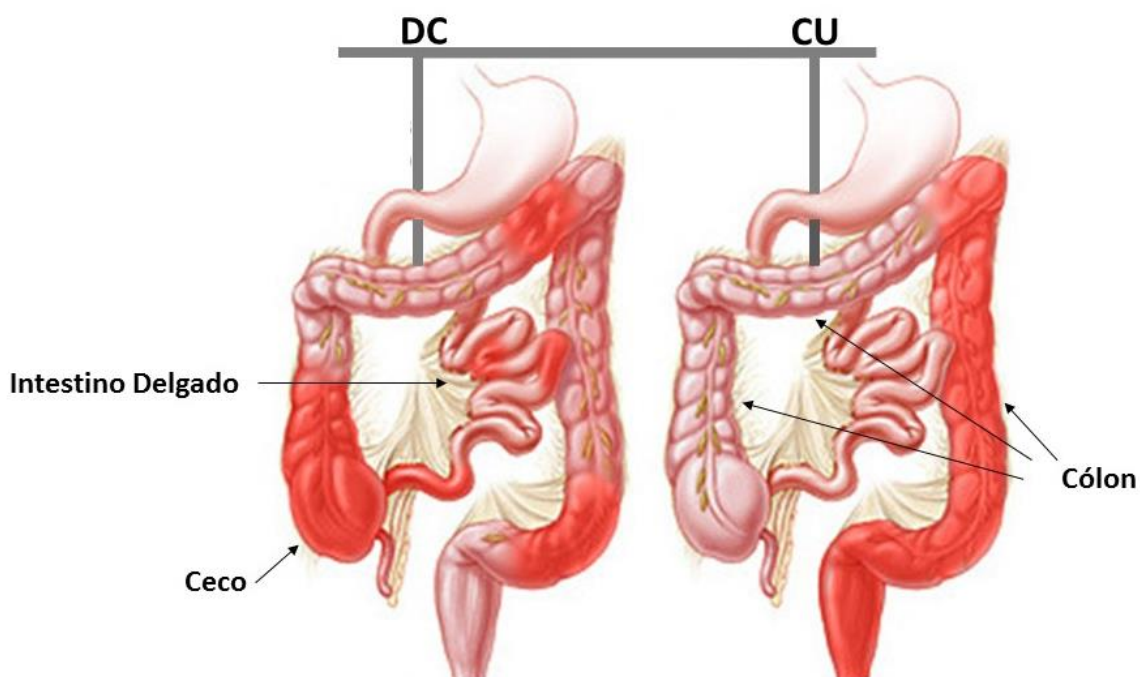
Várias características clínicas e patológicas importantes diferem a DC da CU sugerindo que elas representam entidades clínicas independentes (Tabela 1).

Tabela 1: Principais características das doenças inflamatórias intestinais.

	Colite ulcerativa	Doença de Crohn
Incidência	2,2 a 19,2 casos por 100.000 pessoas por ano	3,1 a 20,2 casos por 100.000 pessoas por ano
Fatores de risco	Genótipo e ambiente (tabagismo- nicotina e apendicectomia como fator de proteção)	Genótipo e ambiente (por exemplo, tabagismo como fator de risco para as formas mais agressivas de doença)
Início da doença	Geralmente entre 15 e 40 anos	Geralmente entre 15 e 40 anos
Área afetada	Cólon	Todo o trato gastrointestinal
Distribuição das lesões	Contínua	Descontínua
Histologia	Mucosa/submucosa; Abscesso de criptas; Úlceras superficiais.	Granulomas transmuralis; Úlceras aftóides
	Colite Ulcerativa	Doença de Crohn
Características macroscópicas	Friabilidade da mucosa; Pseudopolipos; Perda da haustra.	Fístulas
Sintomatologia	Diarreia sanguinolenta Dor abdominal Perda de peso	Diarreia Dor abdominal Perda de peso Febre
Complicações	Hemorragia grave, Megacólon tóxico, Ruptura do intestino e Câncer de cólon	Estenose, Abscesso, Fístulas e Câncer de cólon

Fonte: Adaptado de Neurath et al., 2014 e Thoreson & Cullen, 2007.

Figura 2: Diferença da Doença de Crohn (DC) e Colite Ulcerativa (CU) ao longo do intestino.



Fonte: Adpatado Kim (2017).

A DC é uma doença inflamatória, que tem a capacidade de afetar todo o sistema gastrointestinal, de origem idiopática caracterizada pela inflamação recorrente do trato gastrointestinal (TGI), que pode ser afetado em toda a sua extensão, desde a boca até ao ânus, sendo o íleo e o cólon as porções mais afetadas. Nesta patologia, todas as camadas da mucosa são atingidas, existindo lesões desde a camada mucosa à serosa, no entanto, as lesões não ocorrem de forma contínua ao longo do TGI, estando às áreas lesadas separadas por uma região sem inflamação (LOGANES et al., 2016; YAMAMOTO et al., 2016). Na maioria dos casos, acomete a porção final do cólon e o intestino delgado (LOGANES et al., 2016). Quando é afetado só o cólon (32 %) apesar dos sintomas comuns, como diarreia, aparece também, hemorragia retal e fístulas. O envolvimento do intestino delgado (28 %) e porção gastroduodenal caracterizam-se por diarreia, cólicas, dor na zona abdominal e náuseas, vômitos e anorexia (OLIVEIRA et al., 2017).

Descreve-se a CU como uma inflamação difusa e inespecífica, afetando a mucosa e submucosa, sendo a divisão do tecido acometido pela inflamação e tecido normal bem nítida. O tecido comprometido se apresenta contínuo, podendo ocorrer erosões na mucosa nas formas mais leves da doença e, nas mais graves, até úlceras e comprometimento da camada muscular.

Em microscopia é possível observar infiltrado de neutrófilos na mucosa e na submucosa, linfócitos, eosinófilos, plasmócitos e macrófagos, sinalizando uma resposta crônica da doença (MARANHÃO; VIEIRA; CAMPOS, 2015; LOGANES et al., 2016).

O objetivo terapêutico na CU é induzir a remissão clínica a longo prazo sem esteróides ou aumentar os intervalos de exacerbação aguda. A vigilância do câncer em pacientes com CU é fortemente recomendada, pois esses indivíduos têm um risco elevado de desenvolver o câncer de cólon dentro de 10 anos (LEITNER, 2016). Além disso, a hiperplasia inflamatória excessiva também induz o aparecimento do câncer (DONG et al., 2019). Temos que, o câncer de cólon é um dos cânceres mais comuns e é a quarta principal causa de todas as mortes relacionadas ao câncer no mundo (ZHU et al., 2018). Técnicas avançadas de endoscopia e imagem são necessárias para otimizar o diagnóstico de câncer na CU (LEITNER, 2016).

A etiologia da DII exata não é clara; mas todas são caracterizadas por repetidas alterações crônicas inflamatórias no intestino. As reações inflamatórias resultam na produção de numerosos citocinas e mediadores inflamatórios, causando danos às células epiteliais. Esses danos, diminuem a função da barreira intestinal e promove a reprodução em massa de bactérias patogênicas, quebrando o equilíbrio da microbiota intestinal (HOLD et al., 2014; BISCHOFF et al., 2014).

Temos que, a barreira intestinal é fundamental para a saúde e é um dos sistemas mais metabolicamente dinâmicos do corpo. O intestino deve estar em equilíbrio constantemente, permitindo que moléculas (por exemplo, água, eletrólitos, nutrientes) mantenham longe os antígenos ambientais inflamatórios (BURGE et al., 2019). Além disso, a barreira intestinal deve gerenciar a prevenção da invasão e translocação de bactérias luminas, e também não se tornar hiper-reativa a esses microrganismos (CHO et al., 2016). A barreira intestinal é composta por uma barreira física e bioquímica externa e por uma barreira imunológica interna complementar (BURGE et al., 2019; BISCHOFF et al., 2014). Foi apresentada a barreira intestinal física como um sistema de quatro camadas, onde o fortalecimento em qualquer uma dessas camadas serve para fortalecer a barreira como um todo. Os quatro componentes integrais da barreira física consistem em (1) uma camada de fosfatase alcalina desintoxicante de lipopolissacarídeo (LPS), (2) uma barreira de mucina física que inibe a interação bacteriana com o intestino, (3) junções apertadas e (4) Paneth (WANG; GHOSH & GHOSH, 2017).

A DII está associada a múltiplas manifestações extra intestinais, envolvendo os distúrbios musculoesqueléticos, dermatológicos, sistemas hepatopancreatobiliar, ocular, renal e até pulmonar (JIMENEZ & GASCHÉ, 2019). As interações neuroimunes são encontradas

desempenhando um papel importante na patogênese, resultante de lesão tecidual produzida por neutrófilos e macrófagos, o que tem sido atribuído à capacidade destas células libertarem metabólitos reativos, proteínas citotóxicas e citocinas e aos seus efeitos perturbadores na integridade epitelial (MICHAEL et al., 2009). A patogênese é multifatorial, envolvendo fatores genéticos suscetibilidade, imunidade, ambiente e microbiota (JIMENEZ & GASCHÉ, 2019).

A hipótese mais aceita sobre a patogênese da DII é que respostas imunológicas adquiridas excessivamente agressivas (células T) a um subgrupo de bactérias entéricas comensais se desenvolvem em hospedeiros geneticamente suscetíveis, que exibem uma barreira de epitélio intestinal disfuncional, com aumento da permeabilidade da junção estreita e que os fatores ambientais precipitam o início ou a reativação da doença (VEZZA et al., 2016, SARTOR, 2006). Como forma de melhoria na função da barreira intestinal, temos como um potencial estratégia terapêutica que são as substâncias derivadas de plantas ou fitoquímicos, por exemplo, a curcumina que pode potencialmente oferecer efeitos semelhantes aos do uso de probióticos, embora sejam mais leves e livres desses efeitos incompatíveis (WANG, GHOSH, & GHOSH, 2017).

A desregulação do sistema imune, a disfunção da barreira na mucosa, o estresse oxidativo, a composição alterada da microbiota intestinal no cólon e a suscetibilidade genética de fatores individuais e ambientais, se cruzam de várias maneiras para que a doença se torne clinicamente aparente (SHARMA, SHARMA & WADHWA, 2019) SARTOR, 2006) (Figura 4).

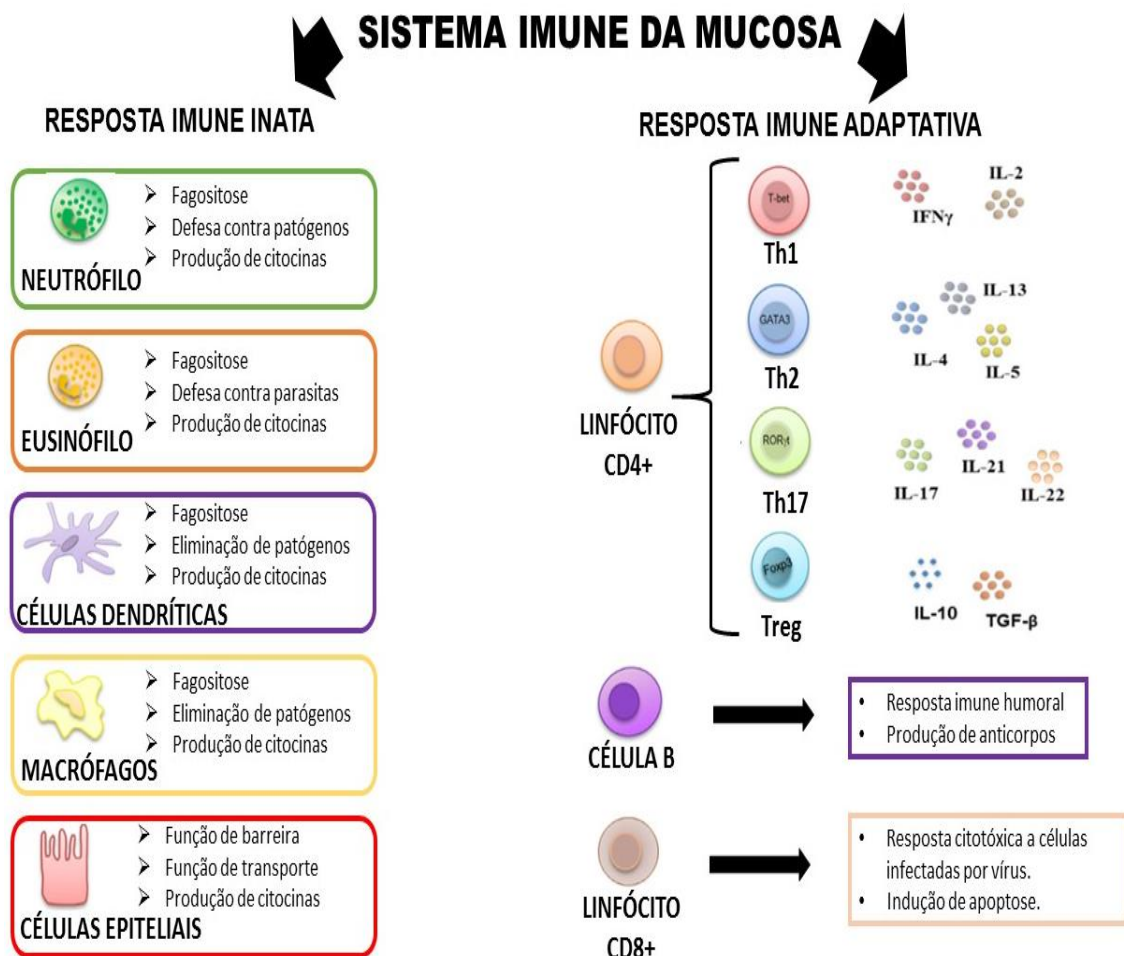
Figura 3: Interação de vários fatores que contribuem para a inflamação intestinal crônica em um hospedeiro geneticamente suscetível



Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

O sistema imune da mucosa constitui um elemento chave na prevenção da penetração de microrganismos. Consiste em respostas imunes inatas e adaptativas. A resposta imune inata é a primeira linha de defesa contra a infecção e incluem proteínas do complemento, granulócitos (basófilos, eosinófilos e neutrófilos), mastócitos, macrófagos, células dendríticas e células natural killer. A resposta imune adaptativa se desenvolve mais lentamente, mas se manifesta como aumento da especificidade antigênica e da memória. Consiste em anticorpos, células B e linfócitos T CD4 + e CD8 +. O rompimento do sistema imune intestinal inato e adquirido pode causar o desenvolvimento de doenças intestinais crônicas (Figura 5). Uma das principais estratégias para combater eficazmente a resposta imune exacerbada, e consequentemente a DII, é interferir em múltiplos estágios da cascata inflamatória com atividade antioxidante capaz de inibir enzimas (VEZZA et al., 2016).

Figura 4: Sistema imune da mucosa intestinal.



Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

3.3. Inflamação Intestinal e o Mecanismo de Sinalização Molecular

Na inflamação intestinal, além de parâmetros químicos como aumento de marcadores inflamatórios inespecíficos como PCR (marcador de atividade) e taxa de sedimentação de eritrócitos, deficiência de ferro e anemia em diferentes gravidades, também é encontrado um padrão distinto de citocinas específicas. As citocinas desempenham papel crucial na patogênese das doenças inflamatórias intestinais (DII), como a doença de Crohn e a colite ulcerativa, controlando múltiplos aspectos da resposta inflamatória. Em particular, o desequilíbrio entre citocinas pró-inflamatórias e antiinflamatórias que ocorre na DII impede a resolução da inflamação e, em vez disso, leva à perpetuação da doença e à destruição tecidual (NEURATH et al., 2014).

Estudos tem mostrado que camundongos IL-10 KO para citocinas reguladoras (como IL-2 e IL-10) desenvolveram colite espontânea, que destacou um papel crucial das citocinas na inflamação intestinal (NEURATH, 2014; STROBER, FUSS & BLUMBERG, 2002). Em particular, um trabalho recente descobriu que mutações na perda de função nos genes que codificam IL-10 e IL-10R estão associados com uma forma muito precoce de DII que é caracterizada por enterocolite severa intratável em lactentes, e que a doença em pacientes com deficiência de IL-10R pode ser aliviada com o transplante de células estaminais hematopoiéticas (NEURATH et al., 2014; KOTLARZ et al., 2012). A interleucina-10 (IL-10) é uma citocina imunossupressora que age após a resposta inflamatória inicial para reprimir a atividade excessiva da citocina pró-inflamatória. Acredita-se que a produção insuficiente de IL-10 crie um desequilíbrio entre os mecanismos pró e anti-inflamatórios e vários estudos mostram que isso afeta a gravidade da DII (MCCANN et al., 2014).

A fisiopatologia das DII envolve o reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), componentes da microbiota comensal, e por receptores do tipo toll (TRL) ou proteínas citoplasmáticas como NOD1 e NOD2. TLRs parecem desempenhar papéis essenciais na homeostase da mucosa e suas alterações contribuem para a patogênese da DII. Pessoas com DII mostram diferentes padrões de TLR expressas na célula epitelial da mucosa. Entre as famílias do TLR, o TLR4 é essencial para o reconhecimento de LPS e desencadear a translocação de NF- κ B, resultando na regulação de citocinas pró-inflamatórias e levando ao desenvolvimento de enterocolite crônica. (NEURATH, 2014; WEI & FENG, 2010).

As células dendríticas da membrana celular e os macrófagos são células apresentadoras de antígenos (APCs) que são encontradas na mucosa inflamada da DII. Após a ativação, estas

células produzem grandes quantidades de citocinas pró-inflamatórias, tais como IL-1 β , IL-6, IL-18 e fator de necrose tumoral (TNF) (NEURATH, 2014).

O TNF é produzido como uma proteína transmembrana a partir da qual TNF solúvel é liberado por clivagem proteolítica via enzima de conversão de metaloproteinases TNF (TACE; também conhecido como ADAM17). A produção do TNF ligado à membrana e solúvel pelas células mononucleares da membrana aumenta acentuadamente em pacientes com DII. Em particular, os macrófagos CD14 +, adipócitos, fibroblastos e células T de pacientes com DII mostraram produzir grandes quantidades de TNF. O TNF exerce várias funções pró-inflamatórias na mucosa inflamada, hipervascularização e angiogênese, aumentando também a produção de citocinas pró-inflamatórias por macrófagos e células T. Os anticorpos específicos do TNF podem ativar simultaneamente várias vias pró-inflamatórias, ligando-se a seus receptores TNFR1 e TNFR2, seguidos da ativação intracelular do fator nuclear do fator de transcrição Kappa B (NF-kB) (LEITNER, 2016, NEURATH, 2014).

A ativação e translocação de NF-kB para o núcleo, induz a transcrição de genes pró-inflamatórios. Acredita-se que ambas as vias NF-kB e AP-1/MAPK desempenham um papel nas doenças inflamatórias intestinais. NF-kB e AP-1 são fatores de transcrição ubíquos que se ligam ao DNA para regular a expressão gênica de genes inflamatórios, diferenciadores, proliferativos e apoptóticos. Assim, como resposta celular a via do NF-kB, o sistema imune aumenta a produção de citocinas pró-inflamatórias como fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), Interferon-gama (INF- γ), Interleucina (IL) -12, IL-1 β , IL-6, IL-13 e IL-17 que agirão como os efetores no processo inflamatório característico das DII (NEURATH et al., 2014). O NF-kB provavelmente é o fator de transcrição dominante envolvido em doenças inflamatórias intestinais e envolve cinco subunidades: p50, p65 (RelA), p52, cRel e RelB (BURGE et al., 2019; DE PLAEN et al., 2007).

Entre as vias de sinalização MAPK, a maioria dos estudos com DII foram sobre p38 quinase, quinase do tipo Nemo (NLK) e o terminal N c-Jun grupo quinase (JNK). Estímulos, por exemplo, citocinas, iniciam a sinalização em cascata, pode fosforilar a jusante da MAP cinase cinase cinases (MAPKKK) através de várias classes de ativação de receptores, como receptores acoplados à proteína G (GPCRs), receptores de citocinas, TLR. Isso leva à fosforilação sequencial das MAP cinase cinases (MAPKK), MAPKs e finalmente as proteínas ativadas a jusante MAPK (MAPAP), a fosforilação indireta de várias proteínas pode afetar a ativação fatores de transcrição, dos quais o mais importante é o NF-kB (WEI & FENG, 2010). Na DII ao se mediar a ativação de NF-kB, a p38 poderia regular a transcrição não apenas de

grande quantidade de citocinas pró-inflamatórias, incluindo TNF- α e ILs, mas também proteínas pró-inflamatórias, como COX-2 (ATREYA, ATREYA & NEURATH, 2008).

Na DC, as disfunções pró-inflamatórias resultam na alteração da resposta do sistema imune intestinal, desencadeando liberação excessiva de citocinas como TNF- α , INF- γ , IL-12, IL-13 e IL-17, mediada por células auxiliaadoras do tipo 1 (TH1) e as citocinas IL-4 e IL-5 envolvidas na CU são mediadas pelas células auxiliaadoras do tipo 2 (TH2). Desta forma, a alteração inicial nas túnicas mucosa e submucosa decorre da infiltração de células inflamatórias nas criptas de Lieberkuhn (CAMBUI & NATALI, 2015).

3.4. Estresse oxidativo e inflamação intestinal

A produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) e de nitrogênio (ERN) constitui um processo contínuo e fisiológico, cumprindo funções biológicas relevantes no organismo humano, sendo que, em concentrações fisiológicas, desempenham funções essenciais ao organismo. Porém, estas em concentrações supra-fisiológicas são prejudiciais ao organismo, causando oxidações de moléculas biológicas podendo levar a danos às lipoproteínas, lípidos, proteínas e DNA e modificações oxidativas induzidas pelo estresse oxidativo das moléculas que têm sido implicadas em muitas vias de doenças, como a da inflamação intestinal (BATISTA et al., 2020; KHARE et al., 2020; MOURA et al., 2015; STROBEL, 2011).

O estresse oxidativo é caracterizado pelo acúmulo intracelular de ERO e ERN e normalmente ocorre nas células como consequência de um desequilíbrio do sistema redox. A instalação do estresse oxidativo se dá por meio de um desequilíbrio entre os fatores pró-oxidantes e antioxidantes, em favor dos primeiros. O sistema de defesa antioxidante tem o objetivo primordial de manter o processo oxidativo dentro dos limites fisiológicos e passíveis de regulação, impedindo que os danos oxidativos se amplifiquem, culminados em danos sistêmicos irreparáveis. Os mecanismos de geração de radicais livres ocorrem, sobretudo, nas mitocôndrias, membranas celulares e no citoplasma (BARBOSA et al, 2010).

A produção de ERO pode ser realizada por diferentes vias, entretanto, a cadeia respiratória mitocondrial é a principal fonte por possuir vários centros redox, capazes de transferir um elétron da molécula de oxigênio para formar ânion superóxido (SCHNEUER et al., 2012). A mitocôndria também possui numerosas proteínas antioxidantes e desacopladoras (UCPs), bem como canais iônicos que modificam o gradiente de prótons. Todos esses fatores se combinam para proporcionar um controle bem ajustado do estado redox celular. Outras

enzimas, como as oxidases de membrana, são também importantes fontes de ERO e ERN que podem se combinar com outras moléculas e modificar a função mitocondrial. Dentre elas, destaca-se o complexo enzimático de membrana NADPH oxidase. Suas subunidades se unem sob ativação e formam uma enzima funcional, que após transferir elétron para o oxigênio molecular, produz o ânion superóxido. Outras fontes de formação de EROs são: xantina oxidase, uma enzima expressa na parede vascular e também circulante no plasma; mieloperoxidase, uma hemoproteína expressa em neutrófilos e monócitos que é secretada durante ativação dessas células, óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) que, sob condições fisiológicas, produz óxido nítrico (NO) que interage com EROs, gerando peroxinitrito ($\text{ONOO}\cdot$). (SOARES et al., 2015; MESTMAN, THYROID & PARATHYROID, 2012; STAGNARO-GREEN et al., 2011).

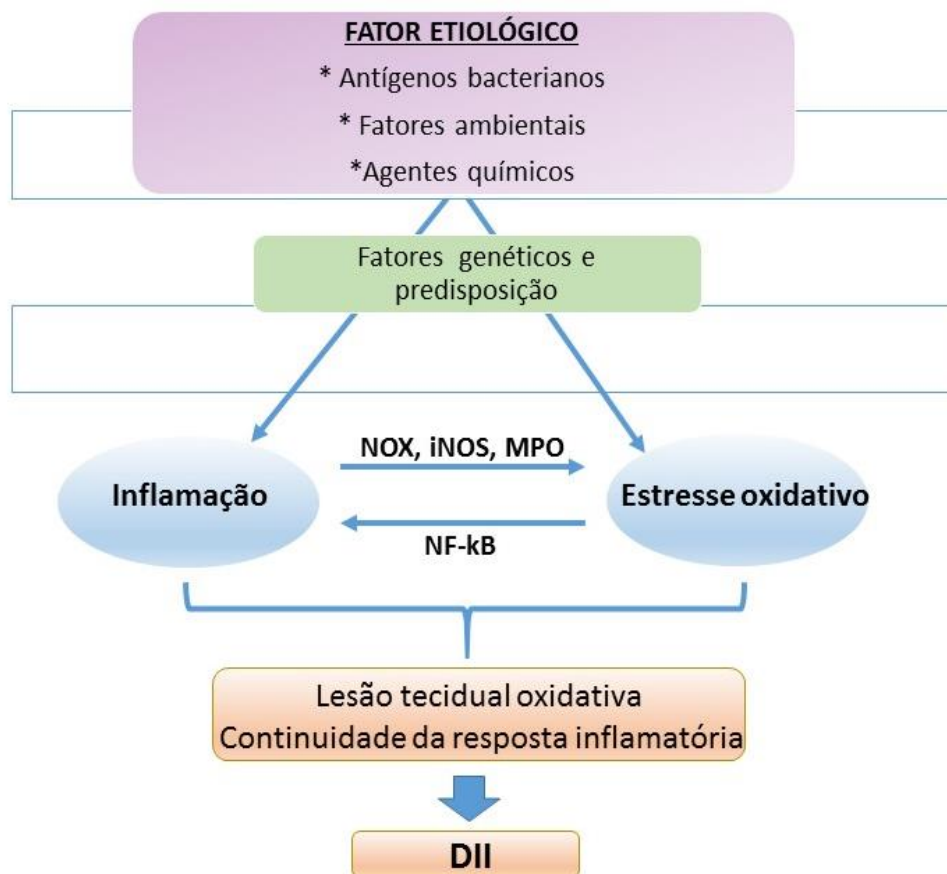
No organismo humano, o sistema de defesa antioxidante consiste em uma série de enzimas antioxidantes além de numerosos compostos antioxidantes endógenos e de origem dietética que reagem com as EROs neutralizando-as. O sistema de defesa antioxidante enzimático inclui superóxido dismutase (SOD), glutathiona peroxidase (GSH-Px) e catalase. As SOD constituem a primeira linha de defesa antioxidante e o maior sistema de defesa do organismo contra o ânion superóxido por catalisar a dismutação do ânion superóxido ($\cdot\text{O}_2^-$) em oxigênio (O_2) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (SCHNEUER et al., 2012). O H_2O_2 formado pela dismutação do $\cdot\text{O}_2^-$ pela SOD é convertido em água (H_2O) e O_2 pela catalase, uma enzima antioxidante localizada em peroxissomos celulares. Além da catalase, a glutathiona peroxidase também remove H_2O_2 por acoplar sua redução com a oxidação da glutathiona reduzida (GSH). A GSH-Px é uma enzima antioxidante que contém selênio e, além de reduzir efetivamente o H_2O_2 , reduz também peróxidos lipídicos a lipídios alcoólicos. Essas enzimas estão presentes no citoplasma em concentrações milimolares e também estão presentes na matriz mitocondrial. (SOARES et al., 2015; BARBOSA et al., 2010; DAMIANI, 2006).

Após exposição celular a EROs e alteração no status redox, há o desencadeamento do processo de transcrição de genes inflamatórios e os fatores de transcrição regulados através de mecanismos redox sensíveis. Neste sentido, a ativação do NF- κ B por EROs estimulam a transcrição de um grande número de genes que codificam citocinas inflamatórias e moléculas de adesão (SEROR et al., 2014; SOARES et al., 2015). Assim, quando o NF- κ B é ativado, várias citocinas pró-inflamatórias, tais como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucinas (IL) 1, 2, 6 e 12 são produzidos em excesso. Além disso, as próprias citocinas podem levar à formação de EROs, que estabelece um ciclo vicioso entre o estresse oxidativo e

a geração de citocinas pró-inflamatórias (SOARES et al., 2015). Assim, a busca por estratégias que promovam a quebra deste ciclo vicioso é fundamental.

O desequilíbrio redox (Figura 6) está envolvido na patogênese e progressão de distintas doenças que tem como característica em comum a inflamação crônica, incluindo as neurodegenerativas, o câncer, as cardiovasculares, o diabetes mellitus e tem sido proposto como um mecanismo subjacente à fisiopatologia da DII (SOARES et al., 2015; ZHU & LI, 2012). Esse desequilíbrio está relacionado com o aparecimento de sinais e sintomas da DII, incluindo diarreia, megacólon tóxico e dor abdominal (DAMIANI, 2006; BARBOSA et al., 2010). Antioxidantes de origem endógena, como as enzimas superóxido dismutase, glutathione peroxidase e s-transferase, e catalase, são capazes de combater o estresse oxidativo na mucosa intestinal. Toda via, o processo inflamatório requer um aumento da demanda por estes importantes antioxidantes, resposta que, nem sempre, é atendida. Como resultado, gera-se uma desigualdade entre os fatores pró-oxidantes e antioxidantes, resultando assim em lesões no epitélio intestinal (TORRES et al., 2011; MANDALARI et al., 2011; MOURA et al., 2015).

Figura 5: Papel do estresse oxidativo e da inflamação na fisiopatologia da DII.



Fonte: Imagem do próprio autor.

Vários estudos experimentais demonstraram um aumento formação de ERO e ERN, incluindo superóxido, peróxido de hidrogênio, ácido hipocloroso e peroxinitrito na mucosa do cólon em modelos animais com DII. As espécies reativas foram frequentemente observadas na fase inicial de processo de doença e correlacionado com a gravidade da doença e progressão (ZHU & LI, 2012). Em estudo experimental foi constatado que a DII também está associada a biomarcadores aumentados de estresse oxidativo, como produtos de peroxidação lipídica no tecido colônico e no sangue (DAMIANI et al., 2007).

As ERO e ERN são geradas após a ativação das células inflamatórias durante o processo da DII. Mas também é possível que a formação aumentada dessas espécies reativas ocorra durante o estágio inicial do processo da doença, podendo ocorrer mesmo antes da sua gênese. Nesse contexto, células epiteliais intestinais mostraram produzir níveis elevados de ERO e ERN na existência de infiltração de células inflamatórias, incluindo neutrófilos e macrófagos, sendo assim uma marca da fisiopatologia da DII. (MALOY & POWRIE, 2011; ZHU & LI, 2012). A formação de EROs na DII envolve enzimas e vias específicas que incluem, xantina oxidase, 5-lipoxigenase, enzimas do citocromo P450 e mieloperoxidase (MPO). Notavelmente, a MPO é uma característica da inflamação intestinal e do estresse oxidativo na DII. De fato, a atividade da MPO no tecido intestinal inflamado é um biomarcador amplamente usado na DII para avaliar a fisiopatologia da doença, bem como a intervenção de antioxidante. A MPO é derivada principalmente de neutrófilos infiltrados (ZHU & LI, 2012).

As células inflamatórias ativadas durante o processo da doença inflamatória intestinal, causa dano oxidativo aos constituintes celulares, incluindo lipídios, levando a lesões adicionais da mucosa, disfunção e agravamento da inflamação que intensificam mais o processo patológico. Nesse contexto, produtos de peroxidação lipídica, como aldeídos reativos, induzem a infiltração e ativação da inflamação da célula (TREVISANI et al., 2007).

Os compostos antioxidantes exógenos dietéticos, que incluem vitamina E (tocoferóis e tocotrienóis), ácido ascórbico (vitamina C), ubiquinona (coenzima Q10), tióis (ácido alfa-lipóico), carotenoides e flavonoides, trazem efeitos aditivos ou sinérgicos na prevenção da gênese da doença e/ou retardamento do desenvolvimento da doença. Os melhores efeitos protetores são frequentemente observados quando os compostos antioxidantes são administrados antes do início da DII experimental. Os efeitos protetores dos compostos antioxidantes são geralmente associados a diminuição de biomarcadores de inflamação e estresse oxidativo no tecido colônico e no sangue. Sabe-se que a dieta é sem dúvida, um fator de grande importância na modulação do estresse oxidativo (STROBEL et al, 2011; BARBOSA

et al, 2010). Como descrito, a inflamação aumenta estresse oxidativo por estimular sistemas geradores de ERO/ERN, como NADPH oxidases (NOX) e óxido nítrico sintase indutível (iNOS), como bem como a liberação de mieloperoxidase (MPO) de células inflamatórias. Por outro lado, o estresse oxidativo e a sinalização redox estão intimamente envolvidos na DII.

3.4.1. Peroxidação de lipídios

Na última década, com o grande desenvolvimento da biologia molecular, foi demonstrado que a obstrução mesentérica seguida de reperfusão ou distúrbios inflamatórios intestinais desencadeia uma enorme produção de radicais livres derivados de oxigênio com efeitos deletérios relevantes na parede intestinal. Essas espécies reativas de oxigênio envolvidas como mediadoras dos fenômenos de isquemia e reperfusão, oxidam proteínas, lipídios ou DNA e causam grave comprometimento da integridade das células intestinais, prejudicando suas funções (JAMEL et al., 2010).

Os ácidos graxos poliinsaturados são mais propensos ao dano oxidativo, em função do maior número duplas ligações de hidrogênio, que são mais susceptíveis à oxidação. O processo de peroxidação lipídica afeta a fluidez da membrana, o funcionamento, a permeabilidade, o potencial de elétrons e o transporte de metabólitos (STROBEL, 2011). O aumento da produção de ERO mitocondrial, pode resultar na peroxidação lipídica que não só é potencialmente prejudicial, mas também um sinal inflamatório que ativa o NF-kB (NENNIG & SCHANK, 2017).

A peroxidação de lipídios é um processo complexo que envolve a interação de radicais livres derivados de oxigênio com ácidos graxos poliinsaturados, que resulta em uma variedade de aldeídos altamente reativos e eletrofílicos. Este fenômeno acontece devido a reações em cadeia de radicais livres. Estes atacam um alílico de carbono para formar um radical central no carbono. O radical reage com O₂ para produzir radicais peroxil. O peroxil pode reagir com lipídios adjacentes, formando um hidroperóxido de lipídio, o qual pode decompor-se para produzir vários produtos de peroxidação lipídica, como a acroleína e seu derivado, o malondialdeído (REED, 2011).

O malondialdeído (MDA) é um aldeído de cadeia curta, sendo um dos compostos medidos pela reação com o ácido tiobarbitúrico (TBARS). A formação de malondialdeído ocorre pela decomposição dos hidroperóxidos lipídicos e sua concentração tem sido utilizada para estimar a intensidade da peroxidação lipídica em sistemas biológicos (células e tecidos).

Nos sistemas biológicos é uma medida importante para avaliação do índice de peroxidação lipídica, servindo como um marcador de estresse oxidativo celular (MAFRA, ABDALLA & COZZOLINO, 1999; ANTUNES et al., 2008).

3.5. Terapia farmacológica e não-farmacológica

As opções de tratamento para a DII é uma estratégia para combater a resposta imune exacerbada é interferir em múltiplos estágios da cascata inflamatória incluindo principalmente o uso aminossalicilatos (sulfasalazina ou mesalazina), imunossuppressores (glicocorticóides, azatioprina, metotrexato e ciclosporina A) e drogas biológicas, que é a terapia anti-TNF com vários anticorpos quiméricos, humanizados ou totalmente humanos (infiximab ou adalimumab) (BERNSTEIN, 2015; NEURATH, 2014).

Esses tratamentos são dispendiosos, frequentemente envolvem efeitos colaterais significativos, e são limitados em eficácia e especificidade. Muitos pacientes não têm resposta para as terapias ou tem uma resposta que não é sustentada (VEZZA et al., 2016).

Estudos em modelos de rato com DII indicaram que a administração de citocinas anti-inflamatórias recombinantes ou a neutralização de citocinas pró-inflamatórias poderia ser usada tanto para a prevenção quanto para a terapia da inflamação intestinal crônica (NEURATH, 2014). Como opção de tratamento com a mesma funcionalidade e menor custosa, temos os flavonoides, produtos fenólicos naturais encontrados em frutas e vegetais comestíveis e que apresentam várias atividades biológicas, principalmente relacionadas às suas propriedades antioxidantes e capacidade de inibir enzimas, o que justifica seu potencial em regularizar a resposta imune (VEZZA et al., 2016). Portanto, eles poderiam ser considerados como drogas potenciais para o tratamento farmacológico da DII.

Existe uma clara demanda por estratégias terapêuticas seguras para a DII humana, em que a planta e seus produtos naturais possam fornecer uma opção para o tratamento alternativo ou suplementar dos pacientes com DII. Assim, escolhas adicionais de tratamento com novos mecanismos de ação são necessárias para aumentar taxas de eficácia do tratamento da DII (SAFARPOUR et al., 2015). Pesquisas recentes indicaram que certos produtos naturais com propriedades anti-inflamatórias, como a curcumina, podem ajudar a domar a inflamação envolvida nas doenças inflamatórias intestinais, melhorando assim a função da barreira intestinal e, potencialmente, os resultados clínicos (VECCHI et al., 2014).

Como opção de tratamento coadjuvante temos a terapia nutricional com a suplementação de ácidos graxos insaturados, que tem como benefício a redução da dor, podendo ser útil na indução e manutenção da remissão ou no controle dos sintomas da DII, especialmente em crianças (LEITNER, 2016).

A composição da dieta em pacientes com DII parece ter grande influência na progressão da doença. Por exemplo, dietas pobres em fibras têm sido associadas a um aumento no desenvolvimento de colite, enquanto dietas ricas em fibras têm sido associadas à proteção contra a doença (BURGE et al., 2019). O aumento da fibra alimentar leva à produção de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), como o butirato, por bactérias comensais e aumentam a função da barreira do epitélio intestinal. O metabolismo do butirato no hospedeiro leva a um ambiente menos propício à disbiose intestinal. Assim temos o butirato conhecido por seu papel benéfico na imunomodulação de células T reguladoras (BURGE et al., 2019; KOH et al., 2016). Sabe-se também que os metabólitos microbianos intestinais afetam a motilidade intestinal por meio de influências indiretas na produção de serotonina, um processo que pode influenciar o desenvolvimento ou progressão da DII (BURGE et al., 2019). A alimentação funcional que são associadas às mudanças no microbioma, são cada vez mais reconhecidas como importantes e provavelmente serão um ponto de ênfase em pesquisas futuras para a DII.

Apesar das dietas ricas em fibras serem recomendação consagrada para pacientes com doença de Crohn não complicada, existem informações contraditórias a respeito. Entre as recomendações dietéticas, aquela à qual comumente se atribui importância para portadores de DII, é a redução do consumo de produtos derivados de leite. Foi detectado também que pacientes com DC ingerem mais carboidratos refinados e ácidos graxos e menor quantidade de frutas e vegetais. Além disso, a DC tem sido descrita com maior frequência nos países desenvolvidos, nos quais é maior o consumo de alimentos industrializados e maior nas áreas urbanas do que nas rurais (BIONDO-SIMÕES et al., 2003; COLOMBEL et al., 2001). Estudo realizado na Irlanda concluiu que pacientes com DC submetidos à dieta reduzida em micropartículas, como aditivos químicos não-nutrientes e contaminantes do solo, apresentaram significativa redução da atividade da doença e da necessidade de corticosteroides, quando comparados àqueles submetidos à dieta comum (BIONDO-SIMÕES et al., 2003).

3.6. Compostos bioativos e a inflamação intestinal

A indicação de uma alimentação diversificada em frutas, legumes e verduras atualmente vai além dos micronutrientes essenciais como as vitaminas e minerais que são encontrados nestes alimentos. Os compostos bioativos presentes nestes ganham cada vez mais destaque na literatura, por meio de seus promissores efeitos benéficos à saúde. Junto a isso a crescente vertente de atuação destes compostos na regulação da expressão gênica exercendo, portanto, influência no genoma humano, torna-se fundamental para o desenvolvimento de novas terapias nutricionais. Além disso, a elucidação dos mecanismos intracelulares pelos quais estes compostos exercem seus efeitos terapêuticos ratifica a compreensão dos benefícios conferidos pelos alimentos, seja na forma preventiva ou terapêutica, na tentativa de reestabelecer o desequilíbrio redox existente em um organismo.

Os polifenóis se enquadram no grupo dos compostos bioativos encontrados na literatura, mas existem outros compostos bioativos, como: a alicina, a quercetina, o licopeno, entre outros. Os polifenóis estão presentes em alimentos de origem vegetal, com cerca de 8.000 compostos já identificados, que representam um grande grupo de metabolitos secundários, consistindo em no mínimo um anel aromático no qual ao menos um hidrogênio é substituído por um grupo hidroxila, este pode ser encontrado nas formas livre (aglicona) ou ligado a açúcares (glicosídeos), proteínas, terpenos, ou outros, e assim podem ser sintetizados pela via do ácido chiquimico, pela via do acetato malonato ou por ambas, esse mesmo processo ocorre com os flavonóides, que possuem biossíntese mista (SCHNEUER et al., 2012). As principais categorias de compostos fenólicos são: os ácidos fenólicos, flavonóides, taninos e estilbenos, porém estas ainda sofrem subdivisões. Esses compostos agem como antioxidantes, não somente pela sua habilidade em doar elétrons, mas também de forma indireta, em virtude de ser um potencial modulador de vias de sinalização antioxidante e anti-inflamatória (SOARES et al., 2015; MANGANARIS et al., 2014).

Os polifenóis dietéticos são compostos não nutritivos funcionais baseados em plantas mais comuns que contêm inúmeros benefícios à saúde e utilizam para a formulação de alimentos nutracêuticos e funcionais. Presente principalmente em vegetais, frutas, cereais, nozes, legumes, sementes, especiarias (açafrão da terra) e ervas os polifenóis dietéticos estão sendo extensivamente estudados por seus potenciais efeitos terapêuticos contra muitas anormalidades da saúde (MEHMOOD et al., 2017). São potentes sequestradoras de radicais livres in vivo, devido sua interação com proteínas envolvidas na transdução de sinais e na

expressão gênica. Um alvo importante da ação dos polifenóis é o principal fator de transcrição inflamatória, o NFκB. Geralmente ligado e inativado pelo inibidor citoplasmático de κB (IκB), o NFκB é liberado de sua associação com este último por IKK quinases ativadas (IKKs). Padrões moleculares associados a patógenos (por exemplo, endotoxina), citocinas inflamatórias (por exemplo, fator de necrose tumoral-α (TNFα), sinais de ativação de células T e espécies reativas de oxigênio desencadeiam cascatas de transdução de sinal que convergem, fosforilam e ativam rapidamente IKKs. O NFκB liberado é então translocado para o núcleo, onde promove a expressão de produtos gênicos inflamatórios, como TNFα, óxido nítrico sintase indutível (iNOS), ciclo-oxigenase (COX) -2, molécula de adesão intercelular e induz a ativação inflamatória de linfócitos. Ao inibir a fosforilação de IKK e / ou prevenir a degradação proteasomal de IκB, numerosas polifenóis atenuam a ativação de NFκB induzida na doença inflamatória intestinal (SHAPIRO et al., 2007; LASTRA & VILLEGAS., 2005; SCALBERT et al., 2005).

Estudo em humanos analisou a influência de três antioxidantes (Butylated hydroxyanisole, tetrahydropapaveroline e nordihydroguaiaretic acid) na produção de citocinas inflamatórias, TNF e interleucinas: IL-1, IL-6 e IL-8 (medidos pelo método ELISA) por células mononucleares periféricas e comparou com biópsias de mucosas colônicas inflamadas de portadores de DII. Observou-se queda na produção de IL-1 e IL-6 pelas células mononucleares periféricas em cerca de 50% do grupo controle. Ainda assim, não houve queda de IL-1 e IL-8 nas biópsias de mucosas colônicas, na mesma intensidade que tenha havido inibição de IL-1. Destaca-se que o efeito inibidor de citocinas dos antioxidantes parece mais pronunciado na RU que na DC.

Trabalhos vem demonstrar os efeitos dos polifenóis na redução da DII. O resveratrol, composto polifenólico encontrado na casca da uva vermelha e no vinho, reduziu a lesão no tecido colônico, suprimiu o dano oxidativo e estimulou a apoptose dos macrófagos (HELLER et al., 2006). A curcumina, obtido da *Curcuma longa* apresentou efeito preventivo e melhora da colite nos animais tratados, graças às suas propriedades antitumorais, antioxidante, anti-inflamatória

Os polifenóis atenuam a lesão das células do parênquima, regulando negativamente os genes inflamatórios e regulando positivamente os citoprotetores. COX-2, ciclo-oxigenase-2; HO-1, hemo-oxigenase-1; IκB, inibidor de κB; ICAM, molécula de adesão intercelular; iNOS, óxido nítrico sintase indutível; NFκB, fator nuclear κ B; Nrf2, fator relacionado ao TNFα. Os polifenóis inibem a síntese de mediadores potencialmente

prejudiciais, ao mesmo tempo que aumentam os mediadores antioxidantes e anti-inflamatórios. (SHAPIRO et al., 2007)

Assim, temos que pesquisas recentes indicaram que certos produtos naturais, ricos em polifenóis, com propriedades antiinflamatórias, como a curcumina, podem ajudar a controlar a inflamação envolvida nas doenças inflamatórias intestinais, melhorando assim a função da barreira intestinal e, potencialmente, os resultados clínicos.

3.7. Açafrão da Terra (*Curcuma longa*)

O açafrão da terra (Figura 6), também conhecido como cúrcuma (Zingiberacea, *Curcuma longa* L.), uma planta perene herbácea tuberosa com flores e folhas largas, que é um membro da família do gengibre e cresce em clima tropical (PRASAD et al., 2014). *C. longa* é um membro perene da família Zingiberaceae, espécie originária do sudeste asiático, sendo ainda encontrado na China, Kuwait Índia e Sri Lanka. O cultivo do açafrão no Brasil é mais expressivo na região Centro-Oeste (MARCHI et al., 2016).

Durante séculos, o açafrão tem sido utilizado em vários países asiáticos como uma especiaria culinária, para conferir sabor e cor característicos, principalmente na base da mistura do curry. O açafrão além de corantes que lhe conferem possibilidade de emprego nas áreas de cosméticos, têxtil e alimentício, também tem seu uso medicinal (ABEROUMAND, 2011). Além de sua principal utilização como condimento, o açafrão é bastante conhecido no combate e prevenção de várias doenças por pelo menos 2500 anos, em sua maioria, nos países asiáticos (GUPTA et al., 2013) e tratamento de muitas doenças na Ayurveda, que é a medicina tradicional chinesa (DEOGADE E GHATE, 2015; BETÜL KOCAADAM & NEVİN ŞANLIER, 2015). Sendo reconhecido popularmente por apresentar efeitos terapêuticos contra inflamação e infecção (GRANT e SCHNEIDER, 2000). Segundo MARCHI e colaboradores (2016) o uso destinado a ação anti-inflamatória e antioxidante a recomendação do extrato seco é de 500 mg 2x ao dia. ARAUJO (2015) descreve que para atividades; antitumoral, antioxidante, anti-inflamatório, antimicrobiano a dose usual do extrato seco padronizado (95%) varia de 300 a 600mg 3x ao dia.

Comercialmente o açafrão é vendido nas formas de pó, óleo resina, óleo essencial e curcumina (CECILIO FILHO et al., 2000).

Figura 6: *Curcuma longa* (Açafrão da Terra), rizoma e extrato.

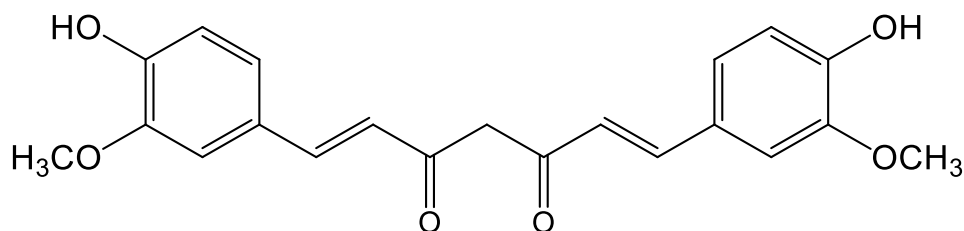


Fonte: BASNET & SKALKO-BASNET, 2011.

O açafrão-da-terra possuem pigmentos curcuminóides que são fitonutrientes, compostos polifenólicos e antioxidantes com destaque para a curcumina, pigmento amarelo, identificado como principal componente ativo obtido do rizoma seco da planta, que atua principalmente nas vias inflamatórias e tem ação antioxidante (PERES; VARGAS; SOUZA, 2015; COLLINO, 2014). O extrato de açafrão contém 77% de curcumina, 17% demetoxicurcumina e 3%, como bem como óleos voláteis (tumerona, atlantona e zingiberona), açúcares, proteínas e resinas. (CHIN, 2016; JURENCA, 2009).

A curcumina (Figura 7) é um diferuloyl metano, membro da família curcuminóide, isolada da *Curcuma longa*, é o principal componente ativo da cúrcuma além de ser a substância responsável pela sua cor amarela vibrante (DEOGADE E GHATE, 2015; JURENCA, 2009). Foi identificado no ano de 1910 por Lampe e Milobedzka. Em meados dos anos 1900, a curcumina era declarado ser um componente biologicamente ativo, ter propriedade antibacteriana e, portanto, ser eficaz contra *Staphylococcus aureus*, *Salmonella paratyphi*, *Mycobacterium tuberculosis* e tipos de *Trichophyton gypseum*. Em 1953, foi determina a existência da curcumina e outros componentes na cúrcuma, chamados de curcuminóides, com a análise da cúrcuma através de cromatografia (KOCAADAM & ŞANLIER, 2017).

Figura 7: Estrutura química da Curcumina.



Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

Com os estudos sobre a curcumina, foi determinado que a estrutura química deste polifenol lipofílico que é quase insolúvel em água, porém estável no pH ácido do estômago (JURENKA, 2009).

A partir de estudos clínicos realizados com seres humanos, foi determinado que a curcumina era segura e eficaz. A FDA (*Food and Drug Administration*), confirmou a curcumina como um composto seguro, que significa que seu consumo não oferece riscos à saúde (CATALAN-LATORRE et al., 2016). (PRASAD et al., 2014; PATIL et al., 2009).

Em relação a absorção de curcumina, embora seja lipossolúvel e, assim, capaz de atravessar livremente a membrana celular (FUJISAWA et al., 2004), a baixa biodisponibilidade faz com que a sua concentração no sangue prejudique seus efeitos terapêuticos (ANAND et al., 2007). Estudos em animais mostraram que a curcumina é metabolizada, conjugada no fígado e excretada nas fezes, tendo, portanto, reduzido a biodisponibilidade sistêmica. Dose intravenosa de 40 mg / kg de curcumina administrada a ratos resultou em depuração completa do plasma em uma hora pós-dose. Uma dose oral de 500 mg/kg administrada a ratos resultou em um pico de concentração plasmática de apenas 1,8 ng/mL, com os principais metabólitos identificados sendo o sulfato de curcumina e glucuronido de curcumina (JURENKA, 2009). Um estudo em animais em ratos revelou que uma dose oral única de curcumina a 500 mg/kg resultou numa concentração sérica máxima de 0,06 µg / mL (SD: 0,01) aos 41,7 minutos (DP: 5,4), equivalente a uma biodisponibilidade oral de 1 % (CHIN, 2016).

Apesar de inúmeros trabalhos que comprovam a atividade dessa planta, os curcuminóides apresentam baixa solubilidade e degradação em meio, o que interfere na atividade terapêutica da planta por prejudicar a absorção de curcuminóides. Porém, existem várias tentativas de melhorar a biodisponibilidade da curcumina, incluindo a administração de curcumina em lipossomas ou nanopartículas lipídicas sólidas, micelas poliméricas ou nanopartículas (LIU et al., 2016).

Dentre as vias de ação da curcumina no processo da DII, estão os fatores de transcrição, as enzimas, os mediadores inflamatórios, os receptores, as proteínas reguladoras do ciclo celular e as moléculas de adesão. A ação da curcumina sobre essas vias se dá por ligações covalentes, hidrofóbicas, não covalentes, e por mecanismos de adaptação de conformação estrutural da curcumina, na qual facilita a sua interação hidrofóbica com o composto de ligação, aumentando a ligação com as macromoléculas alvo (GUPTA et al., 2012; PRASAD et al., 2014). Pesquisas mostram que a curcumina é altamente pleiotrópica molécula capaz de interagir com numerosas moléculas alvos envolvidos na inflamação. A curcumina modula a resposta inflamatória pela regulação negativa da atividade das enzimas: ciclooxigenase-2 (COX-2), lipoxigenase, e óxido nítrico sintase indutível (iNOS); inibe a produção das citocinas inflamatórias: fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucina (IL) -1, -2, -6, -8 e -12 e proteína quimiotática de monócitos (MCP) (JURENKA, 2009; GOEL, KUNNUMAKKARA, AGGARWAL, 2008).

A inibição de COX-2 e iNOS são provavelmente via supressão da ativação do fator nuclear kappa B (NF-kB) pela curcumina, que reduz a ativação do NF-kB e expressão gênica pró-inflamatória bloqueando a fosforilação do fator inibitório I-kappa B quinase (IKB) (SURH, CHUN, CHA, 2001). A supressão da ativação de NF-kB subsequentemente, regula negativamente a expressão de COX-2 e iNOS, inibindo o processo inflamatório. Em um modelo animal de inflamação, a curcumina também inibiu o metabolismo do ácido araquidônico e inflamação na epiderme da pele do camundongo por meio da regulação negativa das vias da ciclooxigenase e da lipoxigenase (KANT et al., 2014; JURENKA, 2009).

A inibição de citocinas inflamatórias pela curcumina são conseguidas através de vários mecanismos de doenças. Estudos in vitro sugerem que a curcumina regula a ativação de determinados fatores de transcrição, como ativação da proteína-1 (AP-1) e NF-kB em monócitos estimulados e macrófagos alveolares, inibindo assim a expressão gênica de citocinas. A regulação negativa de proteínas sinalizadoras intercelulares, como a proteína quinase C, pode ser outra maneira pela qual a curcumina inibe produção de citocinas (JURENKA, 2009). GENG e colaboradores (2017) em seu estudo clínico desmonstrou que a curcumina inibiu a expressão de IL-6 e TNF- α induzida por LPS em macrófagos RAW e possui efeito inibitório sobre fatores inflamatórios como TNF- α , ciclooxigenase-2 (COX2) e IL-6 em células HepG2. SADEGHI e colaboradores (2018) mostraram que a curcumina melhora a inflamação induzida pelo palmitato em células C2C12 (células do músculo esquelético) e indicam que efeitos preventivos são mediados, em parte, pela inibição das vias JNK e NF-kB e do estresse oxidativo. Em estudo com animais VARMA e colaboradores (2017) mostrou a atividade antiinflamatória da

curcumina ao reduzir o nível plasmático das citocinas inflamatórias IL-1 β , IL-6 e TNF- α em ratos com doença renal crônica induzida por adenina. A suplementação de curcumina em ratos diabéticos tratados com STZ reduz os níveis sanguíneos de TNF- α , IL-6 e proteína quimiotática de monócitos-1 (MCP-1) (DEVI et al. 2015). Estudos em humanos também apoiam o efeito antiinflamatório da curcumina, onde o tratamento com curcumina melhorou significativamente a função endotelial e diminuiu o estresse oxidativo e os marcadores inflamatórios (IL-6, TNF- α e endotelina-1) em pacientes com diabetes tipo 2 (PANAHI et al., 2012).

Em relação a DII, o mecanismo principal da curcumina é a supressão dos compostos inflamatórios da DII (NF- κ B) que modulam a resposta imune. Além disso, a atividade da curcumina inclui a supressão da interleucina-1 (IL-1) e do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), duas principais citocinas que desempenham papéis importantes na regulação das respostas inflamatórias (VECCHI et al., 2014).

A curcumina pode modular a expressão de genes envolvidos na defesa antioxidante, eliminar pequenas moléculas oxidativas como o peróxido de hidrogênio (H₂O₂), ânion superóxido, hidroxilo e radical peróxido, inibir a peroxidação lipídica nas membranas celulares e minimizar a resposta inflamatória associada a aterosclerose. Em modelo animal com resistência à insulina, a curcumina contribuiu para o aumento da atividade de enzimas como glutathione, glutathione reductase, superóxido dismutase, catalase e peroxidase, favorecendo a defesa antioxidante (PANAHI et al., 2018).

Ao observar o potencial da curcumina na modulação das via de inflamação é necessário desenvolver formulações ou análogos de curcumina para melhor abordar os problemas de solubilidade e biodisponibilidade relacionados à dosagem de curcumina. Isso também ajudará no avanço do uso da curcumina em vários estados de doença, onde mostrou grande promessa in vitro (CIOCHINA et al., 2013).

3.8. Via transdérmica

A nossa pele é constituída de três vias que ocorre a permeação de substâncias bioativas de forma sistêmica. Temos a via intercelular da matriz extracelular onde sua maior parte é constituída por lipídios; via intracelular onde o ativo adentra nas células queratinosas para atingir o citoplasma; e a via transapêndice, que se aproveita dos folículos pilosos, glândulas sebáceas e sudoríparas para permeação das moléculas (GOMES, 2016). A pele humana

é dotada de um efeito perfeito de barreira, devido à sua camada de estrato córneo, mas não só isso, pois funciona também como uma via de distribuição terapêutica. A penetração de fármacos através da pele pode ser realizada pela via intercelular, intracelular e transpendacial, sendo em ação tópica ou transdérmica. O ativo deve primeiro ser absorvido através da pele, permear a camada córnea e as camadas da epiderme até atingir a derme para assim chegar ao fluxo de sangue e ter a sua ação sistêmica (SILVA & MUNIZ, 2020).

As formas de uma substância atravessar o estrato córneo são divididas em três partes, sendo elas, pela via intercelular que pode ocorrer um espalhamento do ativo com a matriz do estrato, a via transcelular, na qual desloca-se de forma direta pela matriz lipídica e conócitos. E existe também a via apêndices, onde a substância ou ativo é absorvida pelas glândulas sudoríparas e folículos pilosos (SANTOS et al., 2015)

A via transdérmica de distribuição de drogas, visa melhorar a biodisponibilidade, reduzir a toxicidade e, por sua vez, melhorar a adesão do paciente, diversos medicamentos foram desenvolvidos com sucesso nos últimos tempos (NARANG et al., 2017). Entre as formas farmacêuticas semi-sólidas, os géis ganham destaque em produtos dermatológicos e farmacêuticos por apresentarem vantagens em relação aos cremes e pomadas. Algumas destas vantagens são a fácil espalhabilidade, por não serem gordurosos, e por poderem veicular princípios ativos hidrossolúveis e lipossomas através da derme (CORREA et al., 2005). A administração de fármacos através da via transdérmica está em evidência devido a facilidade de aplicação, além de proporcionar maior conforto ao paciente usuário do medicamento (ZANCHETA, 2009).

A utilização da via transdérmica oferece vantagens em diversas circunstâncias quando comparada às outras vias de administração. O metabolismo de primeira passagem hepática, comum para fármacos administrados pela via oral, é o responsável por diminuir a biodisponibilidade e degradar diversos fármacos. Essa via impede que esse efeito de primeira passagem hepática ocorra. Além disso, alguns efeitos indesejáveis no estômago, como ocorrem com antiinflamatórios não esteroidais (AINEs) administrados pela via oral, podem gerar efeitos secundários, como náuseas, dispepsia, diarreia, constipação, ulceração e sangramento na mucosa, o que não ocorre pela via transdérmica (PRASHANT et al., 2018; SILVA et al., 2010; BORTOLON et al., 2008). Oferece também, vantagem sobre a via intravenosa e intramuscular por ser indolor e não invasiva, aumentando a adesão do paciente à terapia (BADRAN et al., 2009).

4. JUSTIFICATIVA

Atualmente existe um grande interesse no estudo de plantas medicinais, pois constituem uma fonte natural de compostos bioativos eficazes que podem ser utilizados em diversas aplicações, principalmente como aditivos alimentares e na promoção da saúde como ingredientes na formulação de fitoterápicos e nutracêuticos, com intuito de encontrar agentes terapêuticos antioxidante e modulador das reações inflamatórias. A curcumina é um composto promissor no combate da inflamação intestinal, porém, apresenta baixa biodisponibilidade oral. Assim, o desenvolvimento de um gel de curcumina de administração via transdérmica visa garantir uma ação sistêmica mais eficaz desse fitofármaco.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

A seguir, a metodologia completa utilizada para a escrita dos artigos 1 e 2

5.1. Preparo do gel transdérmico de curcumina (GTC)

O gel de curcumina (Figura 8) foi obtido através da incorporação no gel de vidro da curcumina (exôdo®) ao gel de permeação transdérmica Pentravan®. Foram produzidos cinco géis transdérmicos de diferentes concentrações, são elas: de 12,5mg de curcumina/g de Pentravan®; 18,8mg de curcumina/g de Pentravan®; 25mg de curcumina/g de Pentravan®; 50 mg de curcumina/g de Pentravan® e 100 mg de curcumina/g de Pentravan®. Com o objetivo de fornecer durante o tratamento uma quantidade igual de gel a todos os animais, reduzindo o erro por de absorção por área corporal, foram aplicados 80 mg por dia de gel transdérmico, sendo as quantidades iguais em todos os grupos experimentais.

A curcumina (Peso molecular: 368,38) segundo o fornecedor, foi originalmente extraída e purificada a partir do rizoma de *Curcuma longa* e considerado $\geq 98,0\%$ de pureza por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

O Pentravan® um veículo transdérmico promotor de permeação cutânea na forma de matriz fosfolipídica composta por biolipídeos em forma de bicamada lamelar, desenvolvida por tecnologia lipossomal gerando micropartículas nanossomais, ocasionando permeação cutânea. Este veículo possui capacidade de interromper a bicamada lipídica do estrato córneo (fluxo dérmico-estrato córneo até a circulação sistêmica via fluxo dérmico-epidérmico) sem dissolvê-la, facilitando a liberação transdérmica de fármacos sem danificá-la, evitando assim o efeito da primeira passagem hepática e favorecendo a adesão com maior eficácia no resultado do tratamento.

Figura 8: Gel transdérmico do curcumina.



Fonte: Imagem do próprio autor.

5.2. Local de execução

As etapas do estudo foram desenvolvidas na Universidade Federal de Viçosa (UFV), nos seguintes laboratórios: O preparo dos géis trasdérmicos (Laboratório de Química e Bioquímica de produtos naturais - BIONAT/UFV); Desenvolvimento do ensaio biológicos (Laboratório de Nutrição Experimental - DNS/UFV); Avaliação do estresse oxidativo (Laboratório Imunoquímica - DBG/UFV); Análise histológica (Laboratório de Biologia Estrutural - DBG/UFV) e estudo in vitro (Laboratório de Patologia Experimental - LPE/UFV)

5.3. Cultivo celular dos macrófagos

Macrófagos murinos RAW 264.7 foram cultivados em meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM – LGC Biotecnologia, Cotia, Brasil) suplementado com soro fetal bovino inativado 10% (SFB – Invitrogen, Nova York, EUA) e penicilinaestreptomicina 1% (5000 U/mL-5000 µg/mL, LGC Biotecnologia). A incubação ocorreu a 37 °C, sob uma atmosfera modificada, contendo 5% de CO₂.

5.4. Atividade sequestradora do radical 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH•)

O ensaio de DPPH foi realizado de acordo com Roesler et al. (2007) com algumas adaptações, no qual os foram previamente diluídos em metanol e 50 µL de cada diluição foram misturados a 250 µL de solução DPPH (0.1 mmol/L) em microplaca de 96 poços.

O controle da reação (reagente DPPH) foi preparado de acordo com o procedimento descrito anteriormente, sem adição de extrato e utilizando o metanol para corrigir a linha de base. A curcumina e derivado da curcumina, foram pesados (1 mg) e diluídos em 1 ml de metanol. A partir dessa solução, foram preparadas soluções de 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175 e 200 µg/ml para cada extrato, que foram as concentrações utilizadas no teste. O mesmo foi feito para os controles positivos, utilizando ácido ascórbico, rutina e Butylated Hydroxytoluene – BHT. A reação foi mantida ao abrigo da luz por um período de 30 minutos, e posteriormente, as absorbâncias foram determinadas a 517 nm em um leitor de microplacas Elisa Multiskan™ FC Microplate Photometer (Thermo Scientific™). Os experimentos foram realizados em triplicata. A capacidade de sequestro de radicais livres foi calculada da seguinte forma:

% inibição = $((A_{DPPH} - A_{\text{composto}}) / A_{DPPH}) * 100$ onde:

A_{DPPH} : absorvância da solução de DPPH;

A_{composto} : absorvância da amostra.

5.4.1. Inibição da desnaturação da albumina

A avaliação da capacidade anti-inflamatória *in vitro* do derivado de curcumina foi avaliada por meio do teste de inibição da desnaturação da albumina. Para isso, adicionou-se 250 μ L da solução de albumina sérica bovina (BSA – bovine serum albumine) a 250 μ L das diferentes concentrações do derivado de curcumina solubilizado em DMSO. Em seguida, a mistura foi colocada em banho de gelo durante 20 minutos e, posteriormente, em banho maria a 72°C por 10 minutos. Por fim, foi acrescentado 1mL de tampão Tris-HCl 20mM pH 5,8 e leu-se a absorvância a 660nm. Como controle positivo foi utilizado o diclofenaco sódico e como controle negativo apenas DMSO. A seguinte fórmula foi utilizada para o cálculo do percentual de inibição:

% inibição = $[(A_0 - A_1) / A_0] * 100$ onde:

A_0 : absorvância no controle negativo;

A_1 : absorvância da amostra.

Dessa forma, valores negativos indicam aumento da desnaturação da albumina, enquanto valores positivos indicam prevenção da desnaturação da albumina.

5.4.2. Ensaio de viabilidade celular

O ensaio de viabilidade celular foi avaliado pelo método de redução do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT), seguindo a metodologia descrita por Kim, 2011, com algumas adaptações.

Células de macrófagos RAW 264.7 foram cultivadas em placas de 96 poços a uma densidade de 2x10⁴ células/poço em 200 μ L de meio de cultura DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino e 100 U/ml de estreptomicina/penicilina em estufa a 37°C e 5% de CO₂. Após um período de 24 horas de incubação, o sobrenadante foi substituído pela curcumina e o derivado da curcumina em diferentes concentrações 6,25, 12,5, 25, 50, 100 e 200 μ g/ml em meio de cultura + 0,4% de dimetilsulfóxido (DMSO), e a incubação continuou pelas próximas 22 horas. O controle (100% de crescimento) foram células cultivadas apenas em meio de cultura. Foi feito também um controle utilizando meio de cultura + 0,4% de DMSO. Após este

período de incubação, retirou-se 50 µL do sobrenadante e adicionou 50 µL de solução de MTT (0,5 mg/ml) a cada poço, e as células foram incubadas novamente na estufa por um período de 2 horas. Após este período, o sobrenadante foi retirado e 150 µL de DMSO foram adicionados aos poços.

A absorbância foi lida em um Leitor de Microplaca Elisa Multiskan Ascent (Thermo Labsystems, Franklin, MA, EUA) ajustado para 570 nm. Os experimentos foram realizados em triplicatas.

5.4.3. Avaliação da viabilidade celular após indução ao estresse oxidativo com H₂O₂

O H₂O₂ foi utilizado para a indução do estresse oxidativo como descrito por BALEKAR et al. (2012) e PONNUSAMY et al. (2015). Inicialmente, o teste de viabilidade celular utilizou a curcumina e o derivado da curcumina para a definição das concentrações a investigar. Assim, as concentrações que promoveram as maiores taxas de viabilidade celular, após 24 h de exposição, foram selecionadas para este experimento.

Células de macrófagos RAW 264.7 foram cultivadas em placas de 96 poços a uma densidade de 2x10⁴ células/poço em 200 µL de meio de cultura DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino e 100 U/ml de estreptomicina/penicilina em estufa a 37°C e 5% de CO₂. Previamente à realização dos experimentos, uma curva de concentrações de H₂O₂ (0,0625; 0,125; 0,25; 0,5 e 1,0 mM) foi construída, a fim de determinar a dose que provocaria a redução da viabilidade celular em 80%, após 24 h de exposição. A concentração 1mM de H₂O₂ demonstrou o efeito referido.

5.4.4. Avaliação da capacidade citoprotetora dos compostos in vitro

Para o tratamento, as células de macrófagos RAW 264.7 foram inoculadas em meio de cultura DMEM suplementado com SFB 10% contendo curcumina em diferentes concentrações (6,25, 12,5, 25, 50, 100 e 200 µg/ml) por 24 horas, posteriormente, submetido a uma exposição com H₂O₂ por 3 horas.

5.5. Ensaio biológico *in vivo*

Todos os procedimentos experimentais com os animais foram realizados em consonância com os princípios éticos da experimentação animal, sendo a pesquisa submetida e aprovada pelo Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Viçosa (CEUA-UFV) sob protocolo número: 41/2019.

5.5.1. Animais

Os animais utilizados no experimente é um modelo já descrito na literatura para inflamação intestinal (NEURATH, 2014; MIZOGUCHI & MIZOGUCHI, 2010; BYRNE & VINEY, 2006). Nas condições de alojamento convencionais, os camundongos IL-10 KO desenvolvem colite espontânea com 100% de incidência na semana 12 e desenvolvem colite crônica na semana 18. Segundo Koboziev e colaboradores os camundongos com ruptura direcionada (ou seja, deleção) do gene da IL-10 desenvolvem pancolite espontânea e inflamação cecal entre 8 a 16 semanas de idade. A característica histológica apresentada por esses ratos mostra semelhanças com pacientes com DII humana (SINGH et al., 2012).

O processo da DII nos animais IL-10 KO acontece da seguinte forma: Primeiro, a inflamação crônica do intestino é mediada pelas células T. Segundo, as bactérias entéricas comensais conduzem à inflamação intestinal, fornecendo estimulação antigênica e adjuvante contínua. Terceiro, a imunorregulação defeituosa promove a inflamação crônica e, finalmente, o contexto genético do animal modula o início, a gravidade e o fenótipo da doença (KOBOZIEV et. al., 2011).

Foram utilizados um total de 52 camundongos fêmeas C57BL/6 - IL-10 KO (espécie *Mus musculus*, variedade black, classe Mammalia), recém-desmamados, com 28 dias de idade, obtidos do Biotério do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa (MG). Os animais, até o 60º dia de idade, ficaram mantidos em caixas de polietileno, consumindo ração comercial (Presence/InVivo® Nutrição Animal) e água destilada *ad libitum*. A temperatura da sala de experimentação foi controlada em 22°C ± 3°C, com ciclo claro/escuro de 12 horas. Na 10ª semana, adultos jovens e fase inicial da DII, foram alocados em gaiolas de aço inoxidável individuais, em ambiente com temperatura controlada de 22°C ± 3°C, com ciclo de luz de 12 horas.

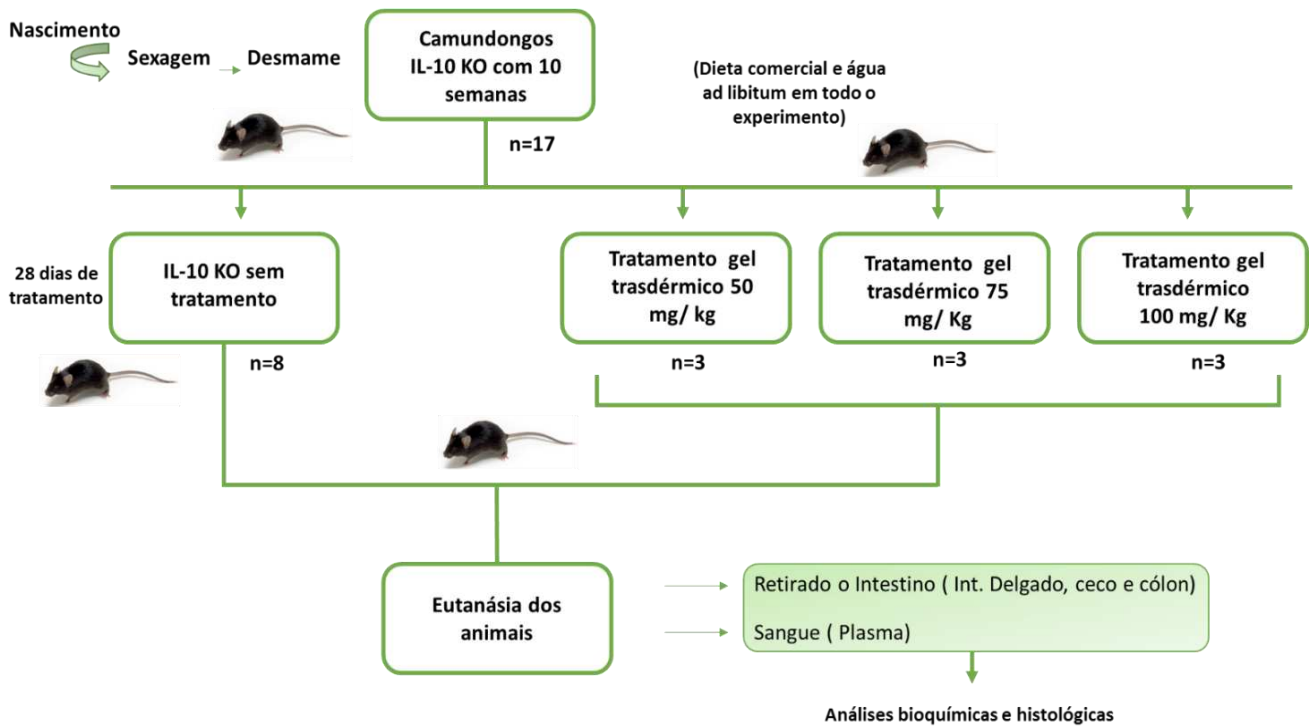
Os animais de cada grupo receberam uma dose diária de 80 mg das formulações, resultando numa dose de 1 mg de curcumina/dia para o grupo C50; 1,5 mg curcumina/dia para o grupo C75; 2,0 mg curcumina/dia para o grupo C100; 4,0 mg curcumina/dia para o grupo C200 e 8,0 mg curcumina/dia para o grupo C400.

5.5.2 Grupos experimentais

O experimento foi dividido em 2 etapas. Na primeira etapa, os animais na 10^a semana de vida foram divididos em 4 grupos experimentais, 1) controle positivo (n=8, veículo via transdérmica); 2) C50 (n=3, veículo + curcumina 50mg/Kg); 3) C75 (n=3, veículo + curcumina 75mg/Kg) e 4) C100 (n=3, veículo + curcumina 100mg/Kg) (Figura 9). E na segunda parte os animais na 10^a semana de vida foram divididos também em 4 grupos experimentais: 1) controle positivo (n=5, veículo via transdérmica); 2) C100 (n=5, veículo + curcumina 100mg/Kg de peso do animal); 3) C200 (n=5, veículo + curcumina 200mg/Kg de peso do animal) e 4) C400 (n=5, veículo + curcumina 400mg/Kg de peso animal) (Figura 10).

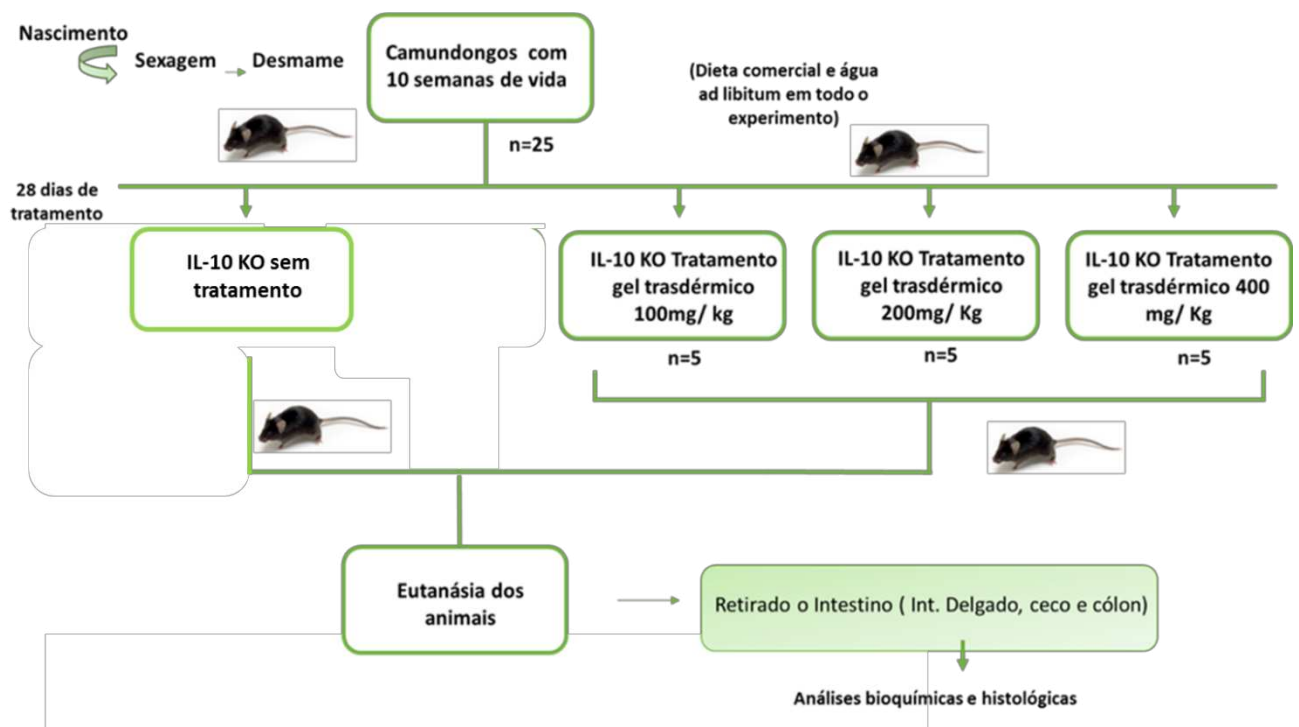
Nas duas etapas os grupos experimentais foram randomizados, de modo que não houve diferença maior que 3,0 g entre as médias dos pesos dos grupos, atendendo à recomendação da AOAC (1997). O esquema de randomização dos animais foi gerado utilizando-se o software online Reserch Randomizer® disponível no site < <https://www.randomizer.org/>>. A semelhança entre a média de peso dos animais dos grupos experimentais foi utilizada para avaliar a eficácia da randomização. Após a randomização os animais foram tricomizados na região dorsal distal, com auxílio de uma lâmina cortante, em uma área de 2 cm². As tricomizações seguintes ocorreram semanalmente para uma melhor absorção do gel transdérmico.

Figura 9: Desenho Experimental da primeira etapa. IL10KO (camundongos C57BL/6 knockout da interleucina 10).



Fonte: Imagem do próprio autor.

Figura 10: Desenho Experimental da segunda etapa. IL10KO (camundongos C57BL/6 knockout da interleucina 10).



Fonte: Imagem do próprio autor.

5.5.3. Medidas biométricas

Ao final do experimento foram obtidas medidas biométricas. O ganho de peso corporal foi calculado pelo peso final subtraído pelo peso inicial, o índice de massa corporal (IMC), que foi obtido pela relação entre o peso e o quadrado do comprimento naso-anal (NOVELLI et al., 2007). O intestino delgado, cólon e ceco foram pesados a fim de comparações entre os grupos.

5.6. Eutanásia dos animais

Ao final do experimento, os ratos ficaram em jejum por 12 horas, e anestesiados (com a utilização de Isoflurano 100%, Isoforine, Cristália®, em aparelho de anestesia inalatória conforme resolução 714, de 20 de julho de 2002) e submetidos à eutanásia por punção cardíaca. O sangue foi coletado em seguida submetidos a centrifugação sob refrigeração (4°C) durante quinze minutos a 3500 rpm para separação do plasma e eritrócitos. A pata direita foi removida, 1 reservada para histo dos animais O intestino foi removido inteiro e dissecado em três regiões: cólon, ceco e intestino delgado. Foram separadas duas porções de cada região, sendo que uma delas foi imersa em solução fixadora de Carnoy, para posteriores análises histopatológicas e outra rapidamente congelada em nitrogênio líquido (-196°C) e armazenados em ultrafreezer à temperatura de -80°C até o início das análises.

5.7. Preparação do homogeneizado para análise dos marcadores do estresse oxidativo e da defesa antioxidante no tecido intestinal

Amostras de intestino delgado e cólon (100 mg/ cada tecido) foram maceradas em microtubos e em seguida adicionadas de 1000 µL de tampão fosfato 1M (pH 7,4). Os tubos foram centrifugados a 10.000 xg por 10 min a 4°C e o sobrenadante coletado e armazenado a -80°C.

5.8. Concentração de malondialdeído (MDA)

A determinação de MDA foi feita pelo teste de TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico) (KOHN; LIVERSEDGE, 1944). Em um microtubo foram adicionados 200 µL de homogeneizado e 400 µL de TBARS. Em seguida, as amostras dos segmentos dos intestinos

foram agitadas em vortex por 5 segundos e incubadas em banho-maria por 40 minutos, a 90°C. As amostras foram resfriadas em gelo e adicionadas de 600 µL de n-butanol e agitadas por 2 minutos, seguida por centrifugação a 900 xg por 10 minutos. Foram retiradas 200 µL do sobrenadante e a leitura foi realizada na absorvância de 532nm. Os valores finais foram calculados por meio de curva-padrão sendo utilizado o reagente N-oxil-2,2,2,6,6-tetrametilpiperidima (TMPO), com a concentração variando de 20 µM a 1,25 µM. Os resultados foram em nmol de MDA por miligramas de proteínas (nMol de MDA/mgPTN). A proteína total do homogeneizado foi quantificada, segundo o método de Bradford (1976).

5.9. Atividade da superóxido dismutase (SOD)

A quantificação desta enzima é dada em unidades relativas, sendo uma unidade de SOD definida como a quantidade de enzima que inibe em 50% a velocidade de oxidação do pirogalol. Para preparo das amostras foram utilizados 30 µL de homogeneizado do intestino delgado e cólon, 228µL de tampão fosfato (1M; pH 7,0), 15 µL de pirogalol (100µM; PM=126,11) e 6 µL de MTT (brometo de (3-[4,5- dimetiltiazol-2H]-2,5- difeniltetrazolium) a 1,25mM; PM=414,3). O padrão foi preparado com 258 µL de tampão fosfato, 6 µL de MTT e 15 µL de pirogal. O branco foi preparado com 294 µL de tampão fosfato e 6µL de MTT. A leitura foi feita no espectofotometro (Multiskan Go, Thermo Cientific) a uma absorvância de 570 nm, sendo os resultados expressos em U de SOD / mg de proteína (MARKLUND, 1985), sendo uma unidade (U) de SOD responsável pela redução de 50% da oxidação do pirogalol.

5.10. Atividade da catalase (CAT)

A determinação da atividade da enzima catalase é baseada na sua capacidade de clivar o peróxido de hidrogênio (H₂O₂) em água e oxigênio molecular, conforme descrito por AEBI (1984).

Na cubeta de quartzo para a leitura do padrão no espectofotometro (Thermo Cientific) foram adicionados 10 µL de homogeneizado e 1000 µL de tampão fosfato (100 mM; pH 7,0) e para a leitura das amostras foram adicionadas 10 µL da amostra mais 1000µL de tampão fosfato com H₂O₂. A reação foi iniciada pela adição de 900 µL de H₂O₂ (5 mM). As absorvâncias foram determinadas no espectofotometro (Multiskan Go, Thermo Cientific) nos tempos 0, 30 e 60 segundos, a 240 nm. Água destilada foi utilizada como branco.

Uma unidade (U) de catalase é equivalente a hidrólise de 1mol de H₂O₂ ($\epsilon=39,4 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) por minuto (AEBI, 1984). Usualmente a atividade dessa enzima é representada U catalase/mg de PTN. A absorbância utilizada para o cálculo é o delta obtido das absorbâncias lidas (absorbância no tempo 0 – absorbância a 60 segundos).

5.11. Glutathione Transferase (GST)

O CNDB (1-cloro2,4-dinitrobenzeno; MW 202,6) é metabolizado pela GST conjugado à GSH, com o aumento de absorbâncias (340nm). (HABIG; PABST & JAKOBY, 1976). Para a leitura de 340nmno espectofotometro (Thermo Cientific) foi adicionado na cubeta: 970 μL de tampão fosfato (0,1M pH 7,0) + 10 μL homogenato + 10 μL de CNDB (0,1M diluído em etanol 80%) e 10 μL GSH (0,1 M diluído em tampão fosfato a 100 mM; pH=7,0). E para a leitura do branco: 970 μL de tampão fosfato (0,1M pH 7,0) + 10 μL de CNDB e 10 μL GSH. A solução foi pipetada em cubeta semi-micro de quartzo (1,5 ml) e a leitura das amostras foram realizadas em triplicata nos tempos 0, 30, 60 e 90 segundos. Resultados expressos em $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$., foi utilizada a seguinte equação: $\Delta A_{340} \times \text{diluições}/\epsilon = A_{340} \times 1000 (100 \text{ cubetas} \times 10\text{f}/9.6 = A_{340} \times 104,17$; onde $\epsilon=9.6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (coeficiente de extinção molar).

5.12. Análises histomorfométricas do intestino, colón e ceco

Após 24h de fixação em solução fixadora de Carnoy, os fragmentos de intestino foram desidratados em soluções crescentes de etanol e xileno e incluído em parafina. Para a microtomia foi utilizado um micrótomo rotativo semi-automático (Leica [®] RM2255) e navalhas de aço. Foram obtidos cortes semi seriados de 5 μm de espessura, respeitando-se a distância de 12 cortes entre eles. As preparações foram coradas com Hematoxilina e Eosina (HE) para as análises morfométricas e histopatológicas. As lâminas (BioGlass[®]) foram montadas com o meio de montagem Entellan (Merck, Frankfurt, Germany) e analisadas em microscópio de luz (Nikon Phase Contrast 0,90 Dry[®], Japão) e as imagens capturadas com câmera digital DIGI-PRO 5.0 M por meio de Software Micrometrics SE Premium (Accu-Scope[®]). As análises morfométricas foram realizadas com auxílio do software Image-Pro Plus (versão 4.0.5.29, Media Cybernetics Inc.).

A análise histomorfométrica foi realizada segundo BASTOS et al (2016) e DROBOWOLSKI et al (2012) com modificações. No intestino delgado foram medidos os

seguintes parâmetros: a) altura da camada muscular; b) altura do epitélio na vilosidade; c) altura do epitélio na cripta; d) diâmetro da cripta; e) diâmetro da vilosidade; f) altura da vilosidade. E no ceco e cólon: a) altura da camada muscular; b) altura do epitélio na cripta; c) diâmetro da cripta; d) diâmetro da lâmina própria; e) profundidade da cripta. Todas as medidas foram feitas em 5 pontos diferentes para cada animal. Os resultados para cada animal (repetição) foram apresentados como médias das medidas para o parâmetro em questão.

6. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

A normalidade dos dados foi avaliada pelo teste de Shapiro-Wilk. Os dados que não apresentaram distribuição normal foram transformados em Log10 antes das análises estatísticas paramétricas. A dispersão principal foi expressa em médias \pm desvio padrão (DP). Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância One-way (ANOVA). Os testes post hoc utilizados foram: Newman-Keuls (para o experimento *in vivo*) e Tukey (*in vitro*). Adotou-se o nível de significância igual a 5%. Todas as análises estatísticas foram realizadas pelo programa GraphPad Prism versão 6.01.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABU BAKAR, F. I.; ABU BAKAR, M. F.; RAHMAT, A.; ABDULLAH, N.; SABRAN, S. F.; ENDRINI, S. Anti-gout Potential of Malaysian Medicinal Plants. **Front. pharmacol.**, v. 9, p. 261, 2018.

AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods enzymol.** v.105, p.121-106. 1984.

AHMADI, N.; KOOHI HOSSEINABADI, O. et al. Efeitos antioxidantes e anti-inflamatórios do gel e extrato aquoso de *Melilotus officinalis* L. em Colite Ulcerativa Induzida: Um Modelo de *Rattus norvegicus*. **Ann. Colorectal Res.**, v. 3, n. 2. 2015.

ALGIERI, F.; RODRIGUEZ-NOGALES, A.; RODRIGUEZ-CABEZAS, M. E.; RISCO, S.; OCETE, M. A.; GALVEZ, J. Botanical Drugs as an Emerging Strategy in Inflammatory Bowel Disease: A Review. **Mediat. inflamm.** v. 2015, 2015.

ANAND, P.; KUNNUMAKKARA, A. B.; NEWMAN, R. A.; AGGARWAL, B. B. Bioavailability of curcumin: problems and promises. **Mol Pharm**, v. 4, n. 6, p. 807-818. 2007.

ANDRADE, G. et al. The addition of whole soy flour to cafeteria diet reduces metabolic risk markers in wistar rats. **Lipids health dis.**, v. 12, n. 1, p. 145. 2013.

ANTUNES NETO, J. M. F., RIVERA, R. J. B., CALVI, R. G., RAFFA, M. F., DONADON, C. C., PEREIRA, A. G., & MELO, P. D. S. Níveis comparativos de estresse oxidativo em camundongos em duas situações do limite orgânico: overreaching induzido por treinamento de natação e câncer. **Rev. bras. med. esporte**, v.14, p. 548-552. 2008.

ARAUJO, A. **Curcuma longa – antitumoral, antioxidante, antiinflamatório, antimicrobiano.** Pharma Nostra. 2015.

ATREYA, I. ; ATREYA, R.; NEURATH, M. F. NF-kappaB in inflammatory bowel disease. **J Intern Med**, v. 263, n. 6, p. 591-596. 2008.

BADRAN, M. M.; KUNTSCHE, J.; FAHR, A. Skin penetration enhancement by a microneedle device (Dermaroller®) in vitro: Dependency on needle size and applied formulation. **Eur J Pharm Sci.**, v. 36, n. 4-5, p. 511-523. 2009.

BALEKAR, N. et al. Evaluation of the wound healing potential of *Wedelia trilobata* (L.) leaves. **J. ethnopharmacol.**, v. 141, n. 3, p. 817–824, 2012.

BARBOSA, K. et al. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Rev. Nutr.**, v. 23, n. 4, p. 629-643. 2010.

BARROS, P. A. C., SILVA, A. M. R., & NETO, M. Á. d. F. L. The epidemiological profile of inflammatory bowel disease patients on biologic therapy at a public hospital in Alagoas. **J. coloproctol.**, v.34, n.3, p.131–135. 2014.

BASNET, P., & SKALKO-BASNET, N. Curcumina: uma molécula antiinflamatória de um tempero de curry no caminho para o tratamento do câncer. **Molecules**. v.16, n.6, p.4567-4598, 2011.

BASTOS, C. C. C. et al. Use of *Bidens pilosa* L. (Asteraceae) and *Curcuma longa* L. (Zingiberaceae) to treat intestinal mucositis in mice: Toxicopharmacological evaluations. **Toxicology Reports**, v. 3, p. 279-287, 2016.

BASTOS, D. H. M.; ROGERO, M. M.; ARÊAS, J. A. G. Mecanismos de ação de compostos bioativos dos alimentos no contexto de processos inflamatórios relacionados à obesidade. **Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabolismo**, v. 53, n. 5, p. 646-656, jun. 2009.

BATISTA, J. A., DE AGUIAR MAGALHÃES, D., SOUSA, S. G., DOS SANTOS FERREIRA, J., PEREIRA, C. M. C., DO NASCIMENTO LIMA, J. V. & DOS REIS BARBOSA, A. L. Polysaccharides derived from *Morinda citrifolia* Linn reduce inflammatory markers during experimental colitis. **J. ethnopharmacol.** v.248, p.112303. 2020.

BAUR, J. A.; SINCLAIR, D. A. Therapeutic potential of resveratrol: the in vivo evidence. **Nat. Rev. Drug Discov.**, v. 5, n. 6, p. 493-506, jun. 2006

BERNSTEIN, C. N. Treatment of IBD: Where we are and where we are going. **Am. J. Gastroenterol**, v. 110, n. 1, p. 114-126, jan. 2015.

BIANCHI, M. L. P.; ANTUNES, L. M. G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Rev. Nutr.**, Campinas, v. 12, n. 2, p. 123-130, maio/ago. 1999.

BIONDO-SIMÕES, M. L. P.; MANDELLI, K. K.; PEREIRA, M. A. C.; FATURI, J. L. Opções terapêuticas para as doenças inflamatórias intestinais: revisão. **Rev. Bras. Coloproct**, v. 23, n. 3, p. 172-182, jul./set. 2003.

BISCHOFF, S. C.; BARBARA, G.; BUURMAN, W.; OCKHUIZEN, T.; SCHULZKE, J. D.; SERINO, M.; TILG, H.; WATSON, A.; WELLS, J. M. Intestinal permeability--a new target for disease prevention and therapy. **BMC gastroenterol.**, v. 14, n. 1, p. 189, nov. 2014.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, v. 72, p. 248, 1976.

BORTOLON, F. F.; SATO, M. E.; ANDREAZZA, R. C. S.; BRESOLIN, T. M. B. Effect of enhancers on the in vitro percutaneous absorption of piroxicam from compounding formulations. **Rev. Bras. Farm.**, v. 44, n. 3, p. 433-49, jul./set. 2008.

BOYANAPALLI, S. S. S.; HUANG, Y.; SU, Z.; CHENG, D.; ZHANG, C.; GUO, Y.; RAO, R.; ANDROULAKIS, I. P.; KONG, A. N. Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Curcumin in regulating anti-inflammatory and epigenetic gene expression. **Biopharm. Drug Dispos.** v. 39, n. 6, p. 289-297, jun. 2018.

BRASIL. **Farmacopeia Brasileira, volume 1 / Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. Brasília: Anvisa, 2010. 546p., 1v/il.

BURGE, K.; GUNASEKARAN, A.; ECKERT, J.; CHAABAN, H. Curcumin and Intestinal Inflammatory Diseases: Molecular Mechanisms of Protection. **Int. j. mol. sci.**, v. 20, n. 8, e1912, 2019.

BYRNE, F. R.; VINEY J. L. Mouse models of inflammatory bowel disease. **Curr. Opin. Drug Discov. Devel.** v. 9, n. 2, p. 207-217. 2006.

CAMBUI, Y. R. T.; NATALI, M. R. M. Doenças inflamatórias intestinais: revisão narrativa da literatura. **Rev. Fac. Ciênc. Méd.** Sorocaba, v.17, n. 3, p. 116-119, 2015.

CARUSO, R.; LO, B.C.; NÚÑEZ, G. Host–microbiota interactions in inflammatory bowel disease. **Nat Rev Immunol**, v. 20, p. 411–426, 2020.

CECILIO FILHO, A. B., SOUZA, R. J. D., BRAZ, L. T., & TAVARES, M. (2000). Cúrcuma: planta medicinal, condimentar e de outros usos potenciais. **Ciência Rural**. v.30, p.171-177. 2000.

CHIN, K. Y. The spice for joint inflammation: anti-inflammatory role of curcumin in treating osteoarthritis. **Drug des. dev. ther.**, v. 10, p. 3029-3042, set. 2016. doi: 10.2147/dddt.s117432.

CHO, S. X.; BERGER, P. J.; NOLD-PETRY, C. A.; NOLD, M. F. The immunological landscape in necrotising enterocolitis. **Expert Rev. Mol. Med.**, v. 18, p.e12. 2016.

CIOCHINA, R.; SAVELLA, C.; COTE, B.; CHANG, D.; RAO, D. Synthesis and Characterization of New Curcumin Derivatives as Potential Chemotherapeutic and Antioxidant Agents. **Drug dev. res.**, v. 75, n. 2, p. 88-96. 2013.

COLLINO, L. **Curcumina: de Especiaria à Nutracêutico**. 2014. 88 f. TCC (Graduação) - Curso de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2014.

COLOMBEL, J. F. et al. Interleukin 10 (Tenovil) in the prevention of postoperative recurrence of Crohn's disease. **Gut**, v. 49, n. 1, p. 42-46. 2001.

CORREA, N. M. et al. Avaliação do comportamento reológico de deferentes géis hidrofílicos. **Rev. Bras. Cienc. Farm.**, v. 41, n.1. p. 1-8. 2005.

DA SILVA PITZ, Heloisa et al. Cytoprotective Effects of Jaboticaba (*Plinia peruviana*, Poir. Govaerts) Fruit Peel Extracts against H₂O₂-Induced Oxidative Stress. **Reactive Oxygen Species**, v. 4, n. 11, p. 362-371, 2017.

DAMIANI, C. R.; BENETTON, C. A.; STOFFEL, C.; BARDINI, K. C.; CARDOSO, V. H.; DI GIUNTA, G.; PINHO, R. A.; DAL-PIZZOL, F.; STRECK, E. L. Oxidative stress and metabolism in animal model of colitis induced by dextran sulfate sodium. **J. Gastroenterol. Hepatol.**, v. 22, n. 12, p. 1846-1851, dez. 2007.

DE CARVALHO, A. C. G. et al. Inflammatory bowel disease with erythema nodosum as the initial manifestation—two clinical cases. **Scientia Medica**, v. 28, n. 3, p. 31062, jul./set. 2018.

DE PLAEN, I. G.; LIU, S. X.; TIAN, R.; NEEQUAYE, I.; MAY, M. J.; HAN, X. B.; HSUEH, W.; JILLING, T.; LU, J.; CAPLAN, M. S. Inhibition of nuclear factor-kappaB ameliorates

bowel injury and prolongs survival in a neonatal rat model of necrotizing enterocolitis. **Pediatr. Res.**, v. 61, n. 6, p. 716-721. 2007.

DEVI, Y. S.; DEVINE, M.; DEKUIPER, J.; FERGUSON, S.; FAZLEABAS, A. T. Inhibition of IL-6 signaling pathway by curcumin in uterine decidual cells. **PLoS ONE**, v. 10, n. 5, p. e0125627. 2015.

DOBROWOLSKI, P. et al. Potato fiber protects the small intestinal wall against the toxic influence of acrylamide. **Nutrition**, v. 28, n. 4, p. 428-435. 2012.

DONG, J.; LIANG, W.; WANG, T.; SUI, J.; WANG, J.; DENG, Z.; CHEN, D. Saponins regulate intestinal inflammation in colon cancer and IBD. **Pharmacol. res.**, v. 144, p. 66-72. 2019.

FALLAHI, F.; BORRAN, S.; ASHRAFIZADEH, M. ZARRABI, A.; POURHANIFEH, M. H.; MAHABADY, M. K. SAHEBKAR, A.; MIRZAEI, H. Curcumin and inflammatory bowel diseases: From in vitro studies to clinical trials. **Mol. immunol.**, v.130, p.20-30, 2021.

GENG, S et al. Curcumin attenuates BPA-induced insulin resistance in HepG2 cells through suppression of JNK/p38 pathways. **Toxicol Lett**, v. 272, p. 75-83. 2017.

GRAHAM, D. B.; XAVIER, R. J. Pathway paradigms revealed from the genetics of inflammatory bowel disease. **Nature**, v. 578, n.7796, p.527-539, 2020.

GOMES, A V S. Os tecidos e a nanotecnologia. **Química e Sociedade**. Belo Horizonte. 2016.

GUPTA, S. C.; SRIDEVI, P.; BHARAT, A. B. Discovery of Curcumin, a Component of the Golden Spice, and Its Miraculous Biological Activities. **Clin. exp. pharmacol. physiol.**, v. 39, n. 3, p. 283-299. 2012.

HABIG, W. H., PABST, M. J. & JAKOBY, W. B. Glutathione S-transferases: the first enzymatic step in mercapturic acid formation. **J. biol. chem.**, v. 249, n. 22, p. 7130-7139, 1974.

HASENCLEVER, L.; PARANHOS, J.; COSTA, C. R.; CUNHA, G.; VIEIRA, D. A indústria de fitoterápicos brasileira: desafios e oportunidades. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 22, n. 8, p. 2559-2569. 2017.

HELLER, A. R.; ROSSLER, S.; LITZ, R. J. et al. Omega-3 fatty acids improve the diagnosis-related clinical outcome. **Crit Care Med**, v. 34, n. 4, 972-1009. 2006.

HOLD, G. L.; SMITH, M.; GRANGE, C.; WATT, E. R.; EL-OMAR, E. M.; MUKHOPADHYA, I. Role of the gut microbiota in inflammatory bowel disease pathogenesis: what have we learnt in the past 10 years? **World j. gastroenterol.**, v. 20, n. 5, p. 1192-1210. 2014.

JAMEL, M. J. et al. Blood carbonyl protein measurement as a specific oxidative stress biomarker after intestinal reperfusion in rats. **Acta Cir. Bras.**, São Paulo, v. 25, n. 1, p. 59-62. 2010.

JIMENEZ, K. M.; GASCHE, C. Management of Iron Deficiency Anaemia in Inflammatory Bowel Disease. **Acta haematol.**, v. 140, n. 1, p. 30-36. 2019.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 11^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2008. 533 p.

JURENKA, J. S. Anti-inflammatory properties of Curcumin, a major constituent of *Curcuma longa*: A review of preclinical and clinical research. **Altern. med. rev.**, v. 14, n. 2, p. 141-153. 2009.

KANT, V.; GOPAL, A.; PATHAK, N. N.; KUMAR, P.; TANDAN, S. K.; KUMAR, D. Antioxidant and anti-inflammatory potential of curcumin accelerated the cutaneous wound healing in streptozotocin-induced diabetic rats. **Int. immunopharmacol.**, v. 20, n. 2, p. 322-330. 2014.

KHARE, T; PALAKURTHI, S. S; SHAH, B. M; PALAKURTHI, S.; KHARE, S. Natural Product-Based Nanomedicine in Treatment of Inflammatory Bowel Disease. **Int. J. Mol. Sci.**, n.21, p.3956, 2020.

KIM, E. O. et al. Anti-inflammatory activity of hydroxycinnamic acid derivatives isolated from corn bran in lipopolysaccharide-stimulated Raw 264.7 macrophages. **Food chem. toxicol.**, v. 50, n. 5, p. 1309-1316. 2012.

KIM, Sung-Jo. Curcumin suppresses the production of interleukin-6 in Prevotella intermedia lipopolysaccharide-activated RAW 264.7 cells. **Journal of periodontal & implant science**, v. 41, n. 3, p. 157-163. 2011.

KOCAADAM, B. & ŞANLIER, N. Curcumin, an active component of turmeric (*Curcuma longa*), and its effects on health. **Crit. rev. food sci. nutr.**, v. 57, n. 13, p. 2889-2895. 2017.

KOH, A.; DEVADDER, F.; KOVATCHEVA-DATCHARY, P.; BACKHED, F. From dietary fiber to host physiology: Short-chain fatty acids as key bacterial metabolites. **Cell**, v. 165, n. 6, p. 1332-1345. 2016.

KOTLARZ, D. et al. Loss of interleukin-10 signaling and infantile inflammatory bowel disease: implications for diagnosis and therapy. **Gastroenterology**, v. 143, n. 2, p. 347-355. 2012.

LASTRA, C. A.; VILLEGAS, I. Resveratrol como um agente anti-inflamatório e anti-envelhecimento: mecanismos e implicações clínicas. **Mol Nutr Food Res.**, v. 49, p. 405-430, 2005.

LEITNER, G. C.; VOGELSANG, H. Pharmacological- and non-pharmacological therapeutic approaches in inflammatory bowel disease in adults. **World J Gastrointest Pharmacol Ther**, v. 7, n. 1, p. 5-20. 2016.

LIU, S.; PÉREZ-RUIZ, F.; MINER, J. N. Patients with gout differ from healthy subjects in renal response to changes in serum uric acid. **Joint Bone Spine.**, v. 84, n. 2, p. 183-188. 2016.

LIU, W.; ZHAI, Y.; X, HENG. et al. Oral bioavailability of curcumin: problems and advancements. **J Drug Target**, v. 24, n. 8, p. 694-702, set. 2016.

LOGANES, C.; PIN, A.; NAVIGLIO, S.; GIRANDELLI, M.; BIANCO, A. M.; MARTELOSSI, S.; TOMMASINI, A.; PISCIANZ, E. Altered Pattern Of tumor necrosis factor-alpha production in peripheral blood monocytes from Crohn's disease. **World j. gastroenterol.**, Beijing, v. 22, n. 41, p. 9117-9126, nov. 2016.

LOPEZ, N. J. S. et al. The Extrusion Process as an Alternative for Improving the Biological Potential of Sorghum Bran: Phenolic Compounds and Antiradical and Anti-Inflammatory Capacity. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2016, 8 p., 2016.

MAFRA, D., ABDALLA, D. S. P. & COZZOLINO, S. M. F. Peroxidação lipídica em pacientes com insuficiência renal crônica. **Rev. nutr.**, 12, 205-212. 1999.

MAGRO, F. et al. European consensus on the histopathology of inflammatory bowel disease. **J. crohns. colitis.**, v. 7, n. 10, p. 827-851, nov. 2013.

MALOY, K. J.; POWRIE, F. *Intestinal homeostasis and its breakdown in inflammatory bowel disease.* **Nature**. v. 474, p. 298-306, jun. 2011.

MANDALARI G, BISIGNANO C, GENOVESE T, MAZZON E, WICKHAM M. S. J, PATERNITI I & CUZZOCREA S. International Immunopharmacology Natural almond skin reduced oxidative stress and inflammation in an experimental model of inflammatory bowel disease. **Int. immunopharmacol.** v.11, p. 915-924. 2011.

MANGANARIS, G. A.; GOULAS, V.; VICENTE, A. R. et al. Berry antioxidants: small fruits providing large benefits. **J Sci Food Agric.**, v. 94, n. 5, p. 825-33, mar. 2014.

MARANHÃO, D. D. A.; VIEIRA, A.; CAMPOS, T. Características e diagnóstico diferencial das doenças inflamatórias intestinais. **J. Bras. Med**, v. 103, n. 1, p. 9-15, jan./fev. 2015.

MARCHI, J. P.; TEDESCO, L.; MELO, A. da C.; FRASSON, A. C.; FRANÇA, V. F.; SATO, S. W.; LOVATO, E. C. W. Curcuma longa L., o açafrão da terra, e seus benefícios medicinais. **Arq. Cienc. Saúde - UNIPAR**, Umuarama, v. 20, n. 3, p. 189-194, set./dez. 2016.

MCCANN, M. J.; JOHNSTON, S.; REILLY, K.; MEN, X.; BURGESS, E. J.; PERRY, N. B.; ROY, N. C. The effect of turmeric (*Curcuma longa*) extract on the functionality of the solute carrier protein 22 A4 (SLC22A4) and interleukin-10 (IL-10) variants associated with inflammatory bowel disease. **Nutrients**, v. 6, n. 10, p. 4178-4190, out. 2014.

MEHMOOD et al. Management of hyperuricemia through dietary polyphenols as a natural medicament: A comprehensive review. (2017). **Crit. rev. food sci. nutr.**, v. 59, n. 9, p. 1433-1455, 2019.

MESTMAN, J. H. **Thyroid and Parathyroid Diseases in Pregnancy.** In: GABBE, S. G.; NIEBYL, J. R.; SIMPSON, J. L.; LANDON, M. B.; GALAN, H. L.; JAUNIAUX, E. R. M. et al. *Obstetrics normal and problem pregnancies.* 6th ed. Saunders Elsevier: Philadelphia, 2012, p. 922-953.

MICHAEL, S.; KELBER, O.; HAUSCHILDT, S.; SPANEL-BOROWSKI, K.; NIEBER, K. Inhibition of inflammation-induced alterations in rat small intestine by the herbal preparations STW 5 and STW 6. **Phytomedicine**, v. 16, n. 2/3, p. 161-171, mar. 2009. doi: 10.1016/j.phymed.2008.10.011.

MIZOGUCHI, A.; MIZOGUCHI, E. Animal models of IBD: linkage to human disease. **Curr. Opin. Pharmacol**, v. 10, n. 5, p. 578-587, out., 2010.

MOURA F A, DE ANDRADE K Q, DOS SANTOS, J C F, ARAÚJO O R P & GOULART M O F. 2015. Antioxidant therapy for treatment of inflammatory bowel disease: Does it work? **Redox Biology**. v.6, p.617-639.

NARANG, J. K.; NARANG, R. S.; ALI, J.; BABOOTA, S.; NAGPAL, N.; KAUR, S.; KAUR, H. Nanoemulsions for Improved Efficacy of Phytotherapeutics- A Patent Perspective. **Recent Pat Nanotechnol.**, v. 11, n. 3, p. 194-213, dez. 2017.

NASCIMENTO, C. M. S. A. et al. Regulamentação e Consumo de Fitoterápicos no Brasil como Prática Complementar de Saúde. **International Journal of Nutrology**, v. 11, n. 01, p. S324-S327. Set. 2018

NASCIMENTO, F. R. et al. New antineoplastic agente based on a dibenzoylmethane derivative: citotoxic effect and direct interaction with DNA. **Biophys. chem.**, v. 239, n. 1, p. 1-6, ago. 2018.

NEURATH, M. F. Cytokines in inflammatory bowel disease. **Nat. rev. immunol.**, v. 14, n. 5, p.329-342, abr. 2014.

NIELSEN, S. M.; ZOBBE, K.; KRISTENSEN, L. E.; CHRISTENSEN, R. Nutritional recommendations for gout: An update from clinical epidemiology. **Autoimmun. rev.**, v. 17, n. 11, p. 1090-1096, nov. 2018.

NOVELLI, E. L. B. et al. Anthropometrical parameters and markers of obesity in rats. **Lab. anim.**, v. 41, n. 1, p. 111-119, jan. 2007.

OLIVEIRA, C. et al. Suporte Nutricional na Doença de Crohn. **Acta port. nutr.**, n. 10, p. 44-48, set. 2017.

OHNO, M.; NISHIDA, A.; SUGITANI, Y.; NISHINO, K.; INATOMI, O.; SUGIMOTO, M.; KAWAHARA, M.; ANDOH, A. Nanoparticle curcumin ameliorates experimental colitis via modulation of gut microbiota and induction of regulatory T cells. **PLoS ONE**, v. 12, n. 10, e0185999, out. 2017.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **A Situação Mundial dos Medicamentos Tradicionais, nos Medicamentos Tradicionais: Situação Global, Questões e Desafios**. Genebra, v. 3, p. 1-14, 2011.

PANAHI Y. et al. A. Curcumin as a potential candidate for treating hyperlipidemia: A review of cellular and metabolic mechanisms. **J Cell Physiol**, v. 233, n. 1, p. 141-152, jan. 2018.

PANAHI, Y.; HOSSEINI, M. S.; KHALILI, N.; NAIMI, E.; MAJEED, M.; SAHEBKAR, A. Antioxidant and anti-inflammatory effects of curcuminoidpiperine combination in subjects with metabolic syndrome: a randomized controlled trial and an updated meta-analysis. **Clin Nutr**, v. 34, n. 6, p. 1101-1108, dez. 2015.

PATIL, B. S.; JAYAPRAKASHA, G. K.; CHIDAMBARA MURTHY, K. N.; VIKRAM, A. Bioactive Compounds: Historical Perspectives, Opportunities, and Challenges. **J. agric. Food chem.**, v. 57, n. 18, p. 8142-8160, set. 2009. doi: 10.1021/jf9000132

PERES, A. S.; VARGAS, E. G. A.; SOUZA, V. R. S. Propriedades funcionais da cúrcuma na suplementação nutricional. **Rev. Inter. Pens. Cien.**, v. 1, n. 2, art. 15, jul./dez. 2015.

PRASAD, S.; TYAGI, A. K.; AGGARWAL, B. B. Recent Developments in Delivery, Bioavailability, Absorption and Metabolism of Curcumin: the Golden Pigment from Golden Spice. **Cancer res. treat.**, v. 46, n. 1, p. 2-18, jan. 2014. doi: 10.4143/crt.2014.46.1.2

PRASHANT, P.; SAHEBRAO, B. K.; AMOL, M.; RAOSAHEB, G. Ethosomes - Newer Trend in Transdermal Drug Delivery: A Review. **Int J Pharma Res Health Sci.**, v. 6, n. 3, p. 2586-2590, maio. 2018.

PONNUSAMY, Y. et al. Polyphenols rich fraction of *Dicranopteris linearis* promotes fibroblast cell migration and proliferation in vitro. **J. ethnopharmacol.**, v. 168, p. 305–314, 2015.

QUIGLEY, E. M. M. Gut Bacteria in Health and Disease. **Gastroenterol. hepatol.**, v. 9, n. 9, p. 560-569, set. 2013.

RETNAKUMAR, S. V.; MULLER, S. Pharmacological Autophagy Regulators as Therapeutic Agents for Inflammatory Bowel Diseases. **Trends mol. med.**, v. 25, n. 6, p. 516-537. 2019.

REED, T. T. Lipid peroxidation and neurodegenerative disease. **Free radic. biol. med.**, v. 51, n. 7, p. 1302-1319, 2011.

ROESLER, R.; MALTA, L.G.; CARRASCO, L.C.; HOLANDA, R.B.; SOUSA, C.A.S.; PASTORE, G.M. Atividade Antioxidante de frutas do cerrado. **Ciência Tecnologia Alimentos**, Campinas, v. 27, n.1, p. 53-60, 2007.

SADEGHI, A. et al. Curcumin ameliorates palmitate-induced inflammation in skeletal muscle cells by regulating JNK/NF-kB pathway and ROS production. **Inflammopharmacology**, v. 26, n. 5, p. 1265-1272, out. 2018.

SAFARPOUR, M., KHATAEE, A., & VATANPOUR, V. Effect of reduced graphene oxide/TiO₂ nanocomposite with different molar ratios on the performance of PVDF ultrafiltration membranes. **Separation and purification technology**. v.140, p. 32-42. 2015.

SAMPEY et al. Cafeteria diet is a robust model of human metabolic syndrome with liver and adipose inflammation: comparison to high-fat diet. **Obesity (Silver Spring)**, v. 19, n. 6, p. 1109-1117, jun. 2011.

SANTOS, P O. et al. A nanotecnologia na formulação cosmética. **Revista Belazin**. São Paulo. 2015.

SARTOR, R. B. Mechanisms of Disease: pathogenesis of Crohn's disease and ulcerative colitis. **Nat Rev Gastroenterol Hepatol**, v. 3, n. 7, p. 390-407, jul. 2006.

SCALBERT, A.; MANACH, C.; MORAND, C. et al. Polifenóis dietéticos e a prevenção de doenças. **Crit. Ver. Food Sci. Nutr.**, v. 45, p. 287-306, 2005.

SCHANAIDER, A. et al. Oxidized tissue proteins after intestinal reperfusion injury in rats. **Acta Cir. Bras.**, São Paulo, v. 20, n. 6, p. 434-436, dez. 2005.

SCHNEUER, F. J.; NASSAR, N.; TASEVSKI, V. et al. Association and predictive accuracy of high TSH serum levels in first trimester and adverse pregnancy outcomes. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 97, n. 9, p. 3115-3122, set. 2012. doi: 10.1210/jc.2012-1193.

SEROR, J.; AMAND, G.; GUIBOURDENCHE, J. et al. Anti-TPO antibodies diffusion through the placental barrier during pregnancy. **PLoS One.**, v. 9, n. 1, e84647, jan. 2014. doi: 10.1371/journal.pone.0084647.

SHAPIRO, H.; SINGER, P.; HALPERN, Z.; BRUCK, R. Polyphenols in the treatment of inflammatory bowel disease and acute pancreatitis. **Gut**, v. 56, n. 3, p. 426-436, mar. 2007.

SHARMA, M.; SHARMA, S.; WADHWA, J. Improved uptake and therapeutic intervention of curcumin via designing binary lipid nanoparticulate formulation for oral delivery in inflammatory bowel disorder. **Artif. cells nanomed. biotechnol.**, v. 47, n. 1, p. 45-55, jan. 2019.

SILVA, I. & MUNIZ, B. V. Aplicabilidade da nanotecnologia no desenvolvimento de dermocosméticos. **Revista científica eletrônica de ciências aplicadas da fait**. n. 2. 2020.

SILVA, F. F. Avaliação da citotoxicidade e mecânica de células tumorais tratadas com compostos candidatos a quimioterápicos. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Estrutural), Universidade Federal de Viçosa. 2021.

SILVA, J. A.; APOLINÁRIO, A. C.; SOUZA, M. S. R.; DAMASCENO, B. P. G. L.; MEDEIROS, A. C. D. Administração cutânea de fármacos: desafios e estratégias para o desenvolvimento de formulações transdérmicas. **Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.**, v. 31, n. 3, p. 125-131, abr. 2010.

SINGH, U. P.; SINGH, N. P.; SINGH, B.; HOFSETH, L. J.; TAUB, D. D.; PRICE, R. L.; NAGARKATTI, M.; NAGARKATTI, P. S. Role of resveratrol-induced CD11b⁺ Gr-1⁺ myeloid derived suppressor cells (MDSCs) in the reduction of CXCR3⁺ T cells and amelioration of chronic colitis in IL-10^{-/-} mice. **Brain behav. immun.**, v. 26, n. 1, p. 72-82, jan. 2012.

SOARES, E. R.; MONTEIRO, E. B.; SILVA, R. C.; BATISTA, A.; SOBREIRA, F.; MATTOS, T. ET AL. Compostos bioativos em alimentos, estresse oxidativo e inflamação: uma visão molecular da nutrição. **Revista HUPE**, v. 14, n. 3, p. 64-72, jul./set. 2015.

STAGNARO-GREEN A, ABALOVICH M, ALEXANDER E, et al. Guidelines of the American Thyroid Association for the diagnosis and management of thyroid disease during pregnancy and postpartum. **Thyroid**, v. 21, n. 10, p.1081-1125, out. 2011. doi: 10.1089/thy.2011.0087.

STAMLER, J. S. et al. (S)NO signals: translocation, regulation, and a consensus motif. **Neuron**, v. 18, n. 5, p. 691-696, maio. 1997.

STROBER, W.; FUSS, I. J.; BLUMBERG, R. S. The immunology of mucosal models of inflammation. **An. rev. immunol.**, v. 20, n. 1, p. 495–549, abr. 2002.

SUYENAGA, E. S. **Avaliação da atividade anti-inflamatória de flavonoides por ensaios in vitro e in vivo**. Tese (Doutorado em Farmácia) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 2002

TAN, P. K.; LIU, S.; GUNIC, E.; MINER, J. N. Discovery and characterization of verinurad, a potent and specific inhibitor of URAT1 for the treatment of hyperuricemia and gout. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 665. 2017.

THORESON, R. & CULLEN, J. J. Pathophysiology of inflammatory bowel disease: an overview. **Surg. clin. North America.**, v. 87, n.3, p.575-585. 2007.

TOMASELLO G. et al. Nutrition, oxidative stress and intestinal dysbiosis: Influence of diet on gut microbiota in inflammatory bowel diseases. **Biomed. pap. med. Fac. Univ. Palacky Olomouc Czech Repub.**, v. 160, n. 4, p.461-466, dez. 2016.

TORRES J A P, SANTANA R M, TORRES F A P, MOURA, A R & TORRES NETO J R. Doenças inflamatórias intestinais no Hospital Universitário da Universidade Federal de Sergipe: manifestações extraintestinais. **Revista Brasileira de Coloproctologia**. v.31, p.115-119. 2011.

TREVISANI, M.; SIEMENS, J.; MATERAZZI, S.; BAUTISTA, D. M.; NASSINI, R.; CAMPI, B.; IMAMACHI, N.; ANDRE, E.; PATACCHINI, R.; COTTRELL, G. S.; et al. 4-Hydroxynonenal, an endogenous aldehyde, causes pain and neurogenic inflammation through activation of the irritant receptor TRPA1. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 104, n. 33, p. 13519-13524, ago. 2007.

TSURUYA, Y.; KATO, K.; SANO, Y.; IMAMURA, Y.; MAEDA, K.; KUMAGAI, Y.; SUGIYAMA, Y.; KUSUHARA, H. Investigation of endogenous compounds applicable to drug–drug interaction studies involving the renal organic anion transporters, OAT1 and OAT3, in humans. **Drug Metab Dispos**, v. 44, n. 12, p. 1925-1933, dez. 2016.

TURNER, R. **Screening Methods in Pharmacology, Antiinflammatory Agent, Academic Press**, New York, NY, USA, 1965.

TUROLLA, M. S. R.; NASCIMENTO, E. S. Informações toxicológicas de alguns fitoterápicos utilizados no Brasil. **RBCF, Rev. Bras. Ciênc. Farm.**, v. 42, n. 2, p. 289-306, 2006.

VARMA, S. R.; SIVAPRAKASAM, T. O.; MISHRA, A.; PRABHU, S.; RAFIQ, M.; RANGESH, P. Imiquimod-induced Psoriasis-like inflammation in differentiated Human keratinocytes: its evaluation using curcumin. **Eur. J Pharmacol**, v. 813, p. 33-41, out. 2017.

VECCHI BRUMATTI, L.; MARCUZZI, A.; TRICARICO, P. M.; ZANIN, V.; GIRARDELLI, M.; BIANCO, A. M. Curcumina e doença inflamatória intestinal: potencial e limites de tratamentos inovadores. **Moléculas**, v. 19, n. 12, p. 21127-21153, 2014. doi: 10.3390/molecules191221127.

VEZZA, T.; RODRÍGUEZ-NOGALES, A.; ALGIERI, F.; UTRILLA, M.; RODRIGUEZ-CABEZAS, M.; GALVEZ, J. Flavonoids in Inflammatory Bowel Disease: A Review. **Nutrients**, v. 8, n. 4, p. 211, abr. 2016. doi: 10.3390/nu8040211.

VIEIRA, A. T. et al. Dietary fiber and the short-chain fatty acid acetate promote resolution of neutrophilic inflammation in a model of gout in mice. **J. leukoc. biol.**, v. 101, n. 1, p. 275-284, jan. 2017.

WANG, H.; L. Cheng; D. Lin; Z. Ma; X. Deng. Lemon fruits lower the blood uric acid levels in humans and mice. **Sci. Hortic**, v. 220, p. 4-10, jun. 2017.

WANG, J.; GHOSH, S. S.; GHOSH, S. Curcumin improves intestinal barrier function: Modulation of intracellular signaling, and organization of tight junctions. **Am. J. Physiol. Cell Physiol.**, v. 312, n. 4, C438–C445, abr. 2017.

WEI, J.; FENG, J. Signaling Pathways Associated with Inflammatory Bowel Disease. **Recent Patents on Inflammation & Allergy Drug Discovery**, v. 4, n. 2, p. 105-117, jun. 2010.

YAMAMOTO-FURUSHO, J. K.; BOSQUES-PADILLA, F.; DE-PAULA, J.; GALIANO, M. T.; IBÁÑEZ, P.; JULIAO, F. et al. Diagnóstico y tratamiento de la enfermedad inflamatoria intestinal: Primer Consenso Latinoamericano de la Pan American Crohn's and Colitis Organisation. **Rev. gastroenterol. Méx.**, v. 82, n. 1, p. 46-84, dez. 2016.

ZAHEDIPOUR, F.; HOSSEINI, S. A.; SATHYAPALAN, T.; MAJEED, M.; JAMIALAHMADI, T.; AL-RASADI, K.; BANACH, M.; SAHEBKAR, A. Potential effects of curcumin in the treatment of COVID -19 infection. **Phytotherapy Research**, v.34, n. 11, 2020.

ZANCHETA, B. **Sistema nanoestruturado lipossomal contendo Chalcona CH8 para tratamento da leishmaniose cutânea**. Dissertação (Mestrado) Faculdade de Engenharia Química – UNICAMP. Campinas, SP, 2009.

ZHANG, Z. C. et al. Effects of anthocyanins from purple sweet potato (*Ipomoea batatas* L. cultivar Eshu No. 8) on the serum uric acid level and xanthine oxidase activity in hyperuricemic mice. **Food Funct.**, v. 6, n. 9, p. 3045-3055, set. 2015.

ZHONGFA, L.; CHIU, M.; WANG, J.; CHEN, W.; YEN, W.; FAN-HAVARD, P.; YEE, L. D.; CHAN, K. K. Enhancement of curcumin oral absorption and pharmacokinetics of curcuminoids and curcumin metabolites in mice. **Câncer Chemother. Pharmacol.**, v. 69, n. 3, p. 679-689, mar. 2012. doi: 10.1007 / s00280-011-1749-y.

ZHU, H.; LI, Y. R. Oxidative stress and redox signaling mechanisms of inflammatory bowel disease: updated experimental and clinical evidence. **Exp. biol. med.**, v. 237, n. 5, p. 474-480, maio. 2012. doi: 10.1258/ebm.2011.011358.

ZHU, J. et al. Curcumin Induces Autophagy via Inhibition of Yes-Associated Protein (YAP) in Human Colon Cancer Cells. **Med. sci. monit.**. v. 24, p.7035-7042, out. 2018.

ARTIGO 1

No Prelo

**ANTIOXIDANT AND ANTI-INFLAMMATORY ACTIVITY OF CURCUMIN
TRANSDERMAL GEL IN AN IL-10 KNOCKOUT MOUSE MODEL OF
INFLAMMATORY BOWEL DISEASE**

Anais da Academia Brasileira de Ciências



**Antioxidant and anti-inflammatory activity of curcumin
transdermal gel in an IL-10 knockout mouse model of
inflammatory bowel disease**

Journal:	<i>Anais da Academia Brasileira de Ciências</i>
Manuscript ID	AABC-2020-1378.R1
Manuscript Type:	Original Article
Date Submitted by the Author:	04-Nov-2020
Complete List of Authors:	Araujo, Fernanda; Universidade Federal de Vicosa, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular Felício, Matheus; Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular Lima, Cássio; Instituto Federal do Pará Piccolo, Mayra; Universidade Federal de Vicosa, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular Pizzolo, Virginia; Universidade Federal de Vicosa, Biochemistry and Molecular Biology Bastos, Daniel; Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Biologia Geral Diaz, Gaspar; Universidade Federal de Minas Gerais, Química Orgânica de Oliveira, Leandro; Federal University of Viçosa – UFV, Department of General Biology Peluzio, Maria do Carmo; Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Nutrição e Saúde Diaz, Marisa; Universidade Federal de Vicosa, Biochemistry and Molecular Biology
Keyword:	curcumin, transdermal, model, inflammatory, Antioxidant, anti-inflammatory
Classifications:	Ciências da Saúde (Health Sciences)

SCHOLARONE™
Manuscripts

<https://mc04.manuscriptcentral.com/aabc-scielo>

ABSTRACT

Inflammatory bowel diseases are a group of inflammatory disorders of the gastrointestinal tract. Its prevalence is still low in Brazil, but its incidence is increasing annually. A variety of compounds present in *Curcuma longa* L., particularly curcumin, have been shown to reduce oxidative stress and aid in the prevention of associated diseases. This study aimed to assess the effect of curcumin transdermal gel on oxidative stress and intestinal inflammation in IL-10^{-/-} mice. Female mice were divided into four groups, a control group (C0) treated with vehicle and three experimental groups treated with transdermal gel containing C50, C75, and C100 mg curcumin kg⁻¹ body weight. Colon malondialdehyde concentrations were lower in C50 and C75 groups. C100 treatment led to reduced catalase activity in the small intestine, whereas C50, C75, and C100 treatments resulted in decreased catalase activity in the colon. In contrast, superoxide dismutase activity increased in the small intestine of C50 and C75 mice and decreased in the colon of C50, C75, and C100 mice. Glutathione S-transferase activity increased in the small intestine and decreased in the colon of animals in the C75 group. These findings suggest that curcumin transdermal gel exerts a protective effect against oxidative stress.

Keywords: intestinal inflammation; histology; oxidative stress; curcumin.

1. INTRODUCTION

Inflammatory bowel diseases (IBD) are chronic inflammatory disorders of unknown etiology that affect the gastrointestinal tract. Crohn's disease and ulcerative colitis are the main types of IBD. Environmental, genetic, microbiological, and immunological factors are believed to be involved in the progression and maintenance of these diseases. The major symptoms include mucous bloody diarrhea, fatigue, abdominal pain, and malnutrition (Maranhão, Vieira and Campos, 2015; Vezza et al., 2016). Although the main symptoms are linked to the gastrointestinal tract. The DII is a systemic disease that often presents with conditions associated or extra intestinal manifestations (EIM): dermatological lesions, musculoskeletal, orals, eyepieces, cardiovascular, neurological, hepatobiliary or pancreatic (Greuter & Vavricka, 2019). The worldwide increase in IBD incidence and prevalence is related to modern lifestyles, consumption of ultra-processed foods, and stress (Santos et al., 2015).

Redox imbalance is considered to underlie the pathophysiology of IBD. This mechanism is involved in the pathogenesis and progression of other chronic inflammatory diseases, including neurodegenerative disorders, cardiovascular diseases, and cancer (Soares et al., 2015; Zhu and Li, 2012). Redox imbalance is linked to the occurrence of diarrhea, toxic megacolon, and abdominal pain, important signs and symptoms of IBD (Barbosa et al., 2010; Damiani, 2006). The production of endogenous antioxidant enzymes, such as superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase, glutathione *S*-transferase (GST), and catalase (CAT), is increased during an inflammatory process, as these enzymes are responsible for combating oxidative stress in the intestinal mucosa. However, when the demand for antioxidant enzymes is not met, there is an inequality between pro- and antioxidant factors, leading to the formation of lesions in the intestinal epithelium (Mandalari et al., 2011; Moura et al., 2015; Torres et al., 2011).

Oxidative stress causes genetic modifications in the cell nucleus and acts as a potent inducer of inflammatory responses by altering the synthesis of cytokines, prostaglandins, thromboxane, leukotrienes, adhesion molecules, and chemokines (Haddad, 2002; Jassen-Heiniger, Poynter and Baeurle, 2000; Rauhman and Macnee, 2000). Inflammatory cells activated during IBD pathogenesis cause oxidative damage to cellular constituents, including lipids, leading to additional mucosal damage, dysfunction, inflammation, and intensification of the pathological process. Lipid peroxidation products, such as reactive aldehydes, induce the infiltration and activation of inflammatory cells (Trevisani et al., 2007).

The body requires endogenous production and dietary consumption of antioxidants to prevent oxidative stress and preserve homeostasis. Dietary antioxidants include vitamin E (tocopherols and tocotrienols), ascorbic acid (vitamin C), ubiquinone (coenzyme Q10), thiols (alpha-lipoic acid), carotenoids, and flavonoids (Strobel et al., 2011). These bioactive compounds positively influence the expression of genes involved in intracellular anti-inflammatory signaling and systemic anti-inflammatory responses (Dragano et al., 2013).

Studies have been directed toward the extraction and application of polyphenolic antioxidants for the treatment of IBD, as these compounds show fewer side effects than conventional drugs. Extracts of turmeric (*Curcuma longa* L.) contain a diversity of phenolic antioxidants. Curcumin, a yellow fat-soluble polyphenol and the major component of *C. longa* extract, exerts antioxidant, antimicrobial, anti-inflammatory, antiangiogenic, antimutagenic, and antiplatelet aggregation effects (Vecchi et al., 2014). These characteristics make curcumin beneficial for the prevention or treatment of several diseases, including osteoarthritis, cancer, dyslipidemia, metabolic syndrome, hyperuricemia, nonalcoholic fatty liver disease, anxiety, ischemia/reperfusion injury, diabetes, lung disorders, and dermatological disorders (Devassy et al., 2015; Deogade and Ghate, 2015; Kocaadam and Şanlıer, 2015; Monton, Luprasong and Charoenchai, 2019; Prasad et al., 2014; Sadeghi et al., 2018).

Curcumin has been suggested as a potential drug for digestive diseases, including IBD. However, its low oral bioavailability is a major limitation for its clinical use, as assessed in human and non-human animal models (Vecchi et al., 2014). Curcumin is hydrophobic, unstable at intestinal pH, and rapidly metabolized, resulting in low intestinal absorption and a short half-life (Ohno et al., 2017). The bioavailability problems of many drugs stem from low water solubility, low dissolution rate, and instability in the gastrointestinal tract (Tzankova et al., 2019). In rodents, curcumin undergoes rapid metabolism by conjugation when administered via the oral route, showing low systemic bioavailability (Yadav et al., 2009).

The use of model animals for the study of the DII and other diseases allows elucidating the pathogenesis of the disease and possible treatments. The understanding of the interferences in intestinal mucosa homeostasis caused by chronic inflammation and its immune mechanisms has been facilitated by the using of some model animals (Bamias et al, 2017). The disabled mouse in interleucina-10 (IL-10^{-/-}) has been widely used for studies about the DII. Genetically modified, this animal model develops spontaneously the colitis, with histological changes similar to those observed in humans (Keubler et al, 2015). This study aimed to develop a topical

formulation of curcumin for increased bioavailability and assess its antioxidant and anti-inflammatory effects in an IL-10 knockout mouse model of inflammatory bowel disease.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Preparation of curcumin transdermal gel

The curcumin transdermal gel formulation was developed at the Laboratory of Chemistry and Biochemistry of Natural Products (BIONAT) of the Federal University of Viçosa, Minas Gerais, Brazil. Curcumin from *C. longa* rhizomes (molecular weight 368.38 g; $\geq 98.0\%$ purity, as assessed by high-performance liquid chromatography) was obtained from Sigma–Aldrich. Pentravan[®], a commercial vehicle for transdermal permeation, was used to prepare the formulations. The vehicle is a transdermal gel composed of bilayer phospholipid nanosomes. It has the ability to interrupt the lipid bilayer of the stratum corneum without dissolving it, providing optimal transdermal delivery without damaging the skin structure. This system avoids first-pass metabolism in the gut or liver, favors patient adherence, and improves treatment success.

Transdermal gel formulations were prepared by placing the appropriate amount of curcumin in a glass mortar, adding small portions of vehicle, and vigorously homogenizing the mixture using a pestle. Three formulations were prepared containing 12.5, 18.8, and 25 mg curcumin g⁻¹ vehicle.

2.2. Animals

Seventeen newly weaned (28-day-old) C57BL/6 IL10^{-/-} mice (*Mus musculus*) were used. This animal model was previously reported in the literature for the study of IBD (Byrne and Viney, 2006; Mizoguchi and Mizoguchi, 2010; Neurath, 2014). According to Koboziev and collaborators (2011), IL-10 knockout mice spontaneously develop pancolitis and cecal inflammation at the age of 8 to 16 weeks. The animals were kept in polyethylene boxes with ad libitum access to commercial feed (Presence/InVivo Animal Nutrition) and distilled water under a 12 h light/dark cycle and controlled temperature conditions (22 ± 3 °C). The experiment was initiated when the animals were 60 days old and in the initial stages of IBD. Mice were placed in individual stainless-steel cages and maintained under controlled conditions (22 ± 3 °C, 12 h light/dark cycle).

All experimental procedures were approved by the Animal Research Ethics Committee of the Federal University of Viçosa, Brazil (protocol no. 41/2019).

2.3. Experimental design

At the beginning of the experiment, mice were allocated into 4 groups. The negative control group consisted of 8 animals receiving only vehicle. Each experimental group consisted of 3 animals treated with transdermal gels containing different concentrations of curcumin. The animals were randomly distributed into groups using an online randomizer (Research Randomizer, <https://www.randomizer.org>), in agreement with AOAC recommendations (1997).

The animals were shaved over an area of 2 cm² in the distal dorsal region and received a daily application of 80 µg of transdermal gel for 4 weeks. Treatments contained the following concentrations of curcumin per kilogram of body weight: C0 (control), 0 mg (vehicle only); C50, 50 mg; C75, 75 mg; and C100, 100 mg. These values are equivalent to daily doses of 0, 1.0, 1.5, and 2.0 mg curcumin for C0, C50, C75, and C100, respectively.

At the end of the experiment, the animals were evaluated for body weight gain, being that the gain weight was calculated by the subtraction of the weight in euthanasia day by the weight in the beginning of the experiment., and body mass index (BMI) (Novelli et al., 2007). Then, the animals were anesthetized with 100% isoflurane (Isoforine, Cristália) and euthanized. The intestine was removed whole and dissected into three regions: small intestine, cecum, and colon. A portion of each segment was immersed in Carnoy's fixative for histopathological analysis, and another was stored at -80 °C for analysis of oxidative stress and antioxidant defense markers.

2.4. Preparation of intestine homogenates for analysis of oxidative stress and antioxidant defense markers

The activities of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) glutathione S-transferase (GST) and the levels of malondialdehyde (MDA) were analyzed in the supernatant obtained tissues removed from several animals by independent analysis. For this fragment (100mg) of each region of the intestine were homogenized in ice-cold phosphate buffer (PBS) for 30 s, and centrifuged at 10,000 ×g (4 °C) for 10 min. The supernatant was collected and stored at -80 °C until analysis.

2.5. Malondialdehyde (MDA) concentration

MDA concentration was determined by the thiobarbituric acid reactive substances assay, as described by Kohn and Liversedge (1944). A standard curve of 2,2,6,6-tetramethylpiperidine-*N*-oxyl (TEMPO) was used to calculate MDA values. Results are expressed as nmol MDA mg⁻¹ protein.

2.6. SOD activity

Quantification of SOD activity was performed spectrophotometrically (Multiskan Go, Thermo Fisher Scientific) at 570 nm (Marklund, 1985). One unit (U) of SOD activity was defined as the amount of enzyme required to inhibit the oxidation of pyrogallol by 50%. Results are expressed as U mg⁻¹ protein.

2.7. CAT activity

Determination of catalase activity was based on the conversion of hydrogen peroxide (H₂O₂) to water and molecular oxygen, as described by Aebi (1984). One unit of catalase activity (U) was defined as change in absorbance in 1 min of reaction. Results are expressed as U mg⁻¹ protein.

2.8. GST activity

GST activity was determined by measuring the conjugation of 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB, molecular weight 202.6 g) with glutathione, monitored as an increase in absorbance at 340 nm (Habig, Pabst and Jakoby, 1976). Absorbance readings were performed in triplicate at 0, 30, 60, and 90 min. Results are expressed as μmol min⁻¹ g⁻¹ protein.

2.9. Histomorphometric analysis of the small intestine, colon, and cecum

Tissue fragments were dehydrated in a graded series of ethanol and xylol and embedded in paraffin. A semi-automatic rotary microtome (Leica RM2255) was used to obtain 5 μm thick semi-serial sections. Specimens were mounted on slides (BioGlass) using Entellan mounting medium (Merck), stained with hematoxylin and eosin, and analyzed under a light microscope (Nikon Phase Contrast 0.90 Dry, Japan). Images were captured with a DIGI-PRO 5.0 M digital camera and processed using Micrometrics SE Premium (Accu-Scope). Histomorphometric measurements were performed using Image-Pro Plus version 4.0.5.29 (Media Cybernetics Inc.).

Histomorphometric analysis was conducted according to Bastos et al. (2016) and Drobowski et al. (2012), with modifications. The small intestine was evaluated for muscular layer thickness, villus epithelium thickness, crypt epithelium thickness, crypt diameter, villus diameter, and villus height. The cecum and colon were assessed for muscular layer thickness, crypt epithelium thickness, crypt diameter, lamina propria diameter, and crypt depth. Measurements were taken at five different points per animal for each parameter.

2.10. Statistical analysis

Normality of data distribution was assessed by the Shapiro–Wilk test. Non-normally distributed data were transformed to log₁₀ values for parametric statistical analyses. Results are presented as mean ± standard deviation. One-way analysis of variance was used to analyze

continuous variables. Treatment means were then compared using the Newman–Keuls post-hoc test. The level of significance was set at 0.05. All statistical analyses were performed using GraphPad Prism version 6.01.

3. RESULTS

3.1. Effect of curcumin transdermal gel on body weight

Weight gain was greater ($P < 0.05$) in the C100 group than in the control (C0) but did not differ ($P > 0.05$) between treated groups (C100, C75, and C50) (Fig. 1A). Treatment with curcumin transdermal gel did not alter BMI (Fig. 1B) or weights of the small intestine, colon, and cecum (Fig. 1C) compared with the control.

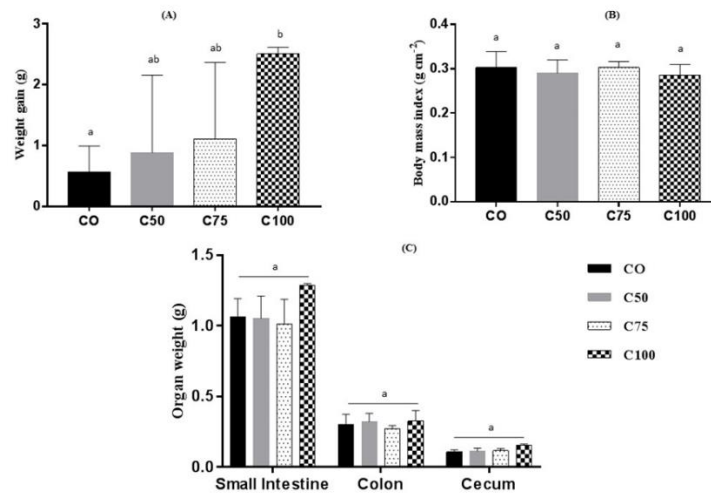


Figure 1. (A) Weight gain, (B) body mass index, and (C) organ weights of IL-10 knockout mice treated with curcumin transdermal gel for 4 weeks.

Different letters above error bars indicate significant differences ($P < 0.05$) by the Newman–Keuls post-hoc test. C0, control (vehicle); C50, transdermal gel containing 50 mg curcumin kg^{-1} body weight (BW); C75, transdermal gel containing 75 mg curcumin kg^{-1} BW; C100, transdermal gel containing 100 mg curcumin kg^{-1} BW.

3.2. Effect of curcumin transdermal gel on oxidative stress

The presence of lipid peroxidation products was determined by measuring MDA levels in the small intestine and colon. MDA levels in the small intestine did not differ ($P > 0.05$) between groups (Fig. 2A). However, colon MDA concentrations were lower ($P < 0.05$) in C50 and C75 mice than in the control but did not differ ($P > 0.05$) between C100 and the other groups (Fig. 2B).

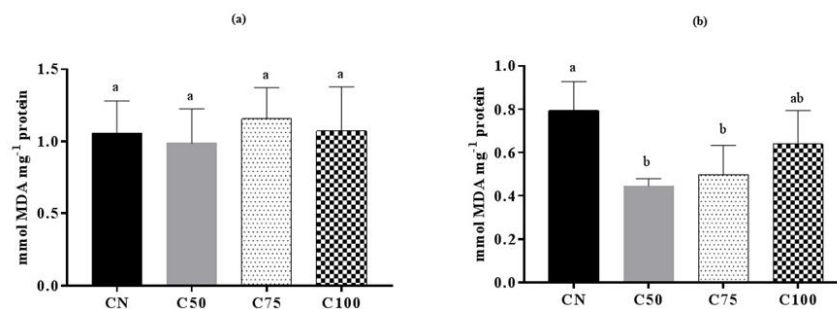


Figure 2. Malondialdehyde (MDA) concentration in the (A) small intestine and (B) colon of IL-10 knockout mice treated with curcumin transdermal gel for 4 weeks.

Different letters above error bars indicate significant differences ($P < 0.05$) by the Newman–Keuls post-hoc test. C0, control (vehicle); C50, transdermal gel containing 50 mg curcumin

kg⁻¹ body weight (BW); C75, transdermal gel containing 75 mg curcumin kg⁻¹ BW; C100, transdermal gel containing 100 mg curcumin kg⁻¹ BW.

CAT activity was lower ($P < 0.05$) in the C100 group than in C0 and C50 groups, but enzyme activity in C75 animals did not differ ($P > 0.05$) from that in C50 and C100 animals (Fig. 3A). C50 and C75 treatments increased ($P < 0.05$) SOD activity in relation to C0 and C100 (Fig. 3B). GST activity was higher ($P < 0.05$) in C75, not differing ($P > 0.05$) from that of C50 and C100 (Fig. 3C). In colon samples, CAT and SOD activities were lower ($P < 0.05$) in treated groups (C50, C75, and C100) than in the control (Fig. 3D–E), whereas GST activity was lowest ($P < 0.05$) in C75 animals, not differing between the other groups (Fig. 3F).

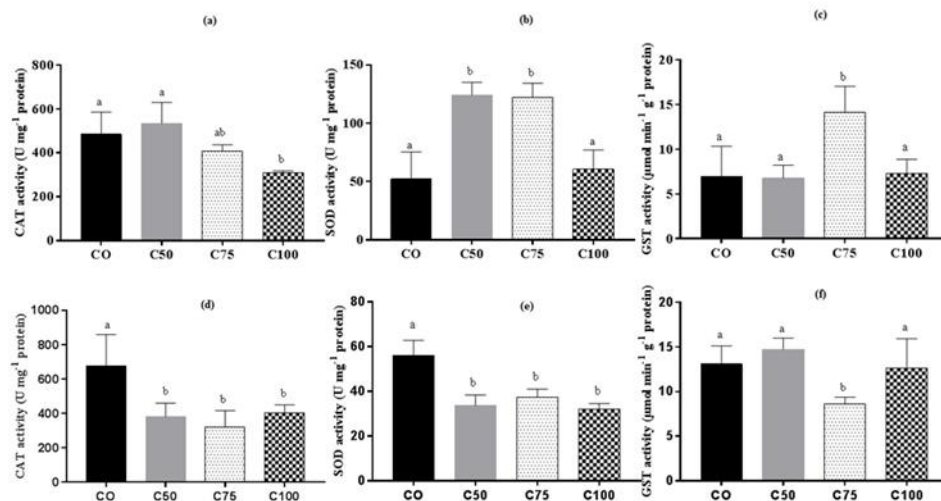


Figure 3. Antioxidant enzyme activity in the small intestine (A, B, and C) and colon (D, E, and F) of IL-10 knockout mice treated with curcumin transdermal gel for 4 weeks.

Different letters above error bars indicate significant differences ($P < 0.05$) by the Newman-Keuls post-hoc test. C0, control (vehicle); C50, transdermal gel containing 50 mg curcumin kg⁻¹ body weight (BW); C75, transdermal gel containing 75 mg curcumin kg⁻¹ BW; C100, transdermal gel containing 100 mg curcumin kg⁻¹ BW; CAT, catalase; SOD, superoxide dismutase; GST, glutathione *S*-transferase.

3.3. Effect of curcumin transdermal gel on the small intestine, colon, and cecum

Histomorphometric analysis revealed no differences ($P > 0.05$) between groups regarding muscular layer thickness, villus epithelium thickness, crypt epithelium thickness, crypt diameter, villus diameter, or villus height in the small intestine (Fig. 4A-F). In the cecum and colon, no differences ($P > 0.05$) were observed in muscular layer thickness, crypt epithelium thickness, crypt diameter, lamina propria diameter, or crypt depth (Fig. 5A-E).

Photomicrographs representative of sections of the small intestine, colon and cecum treated with different doses of curcumin is shown in fig. 6, in the present study, it was not possible to observe the histological modification of the small intestine, colon and cecum treated with different doses of curcumin.

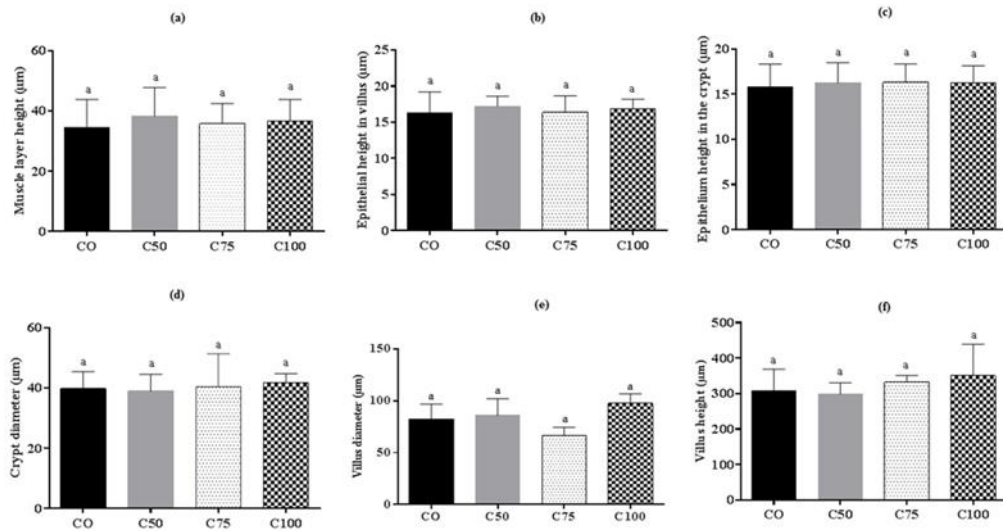


Figure 4. Effect of the curcumin transdermic gel on the small intestine of IL-10 KO mice with intestinal inflammation.

followed by the same letter on the same graph do not differ by the Newman Keuls post-hoc test at 5% probability. C0, control (vehicle); C50, transdermal gel containing 50 mg curcumin kg^{-1} body weight (BW); C75, transdermal gel containing 75 mg curcumin kg^{-1} BW; C100, transdermal gel containing 100 mg curcumin kg^{-1} BW.

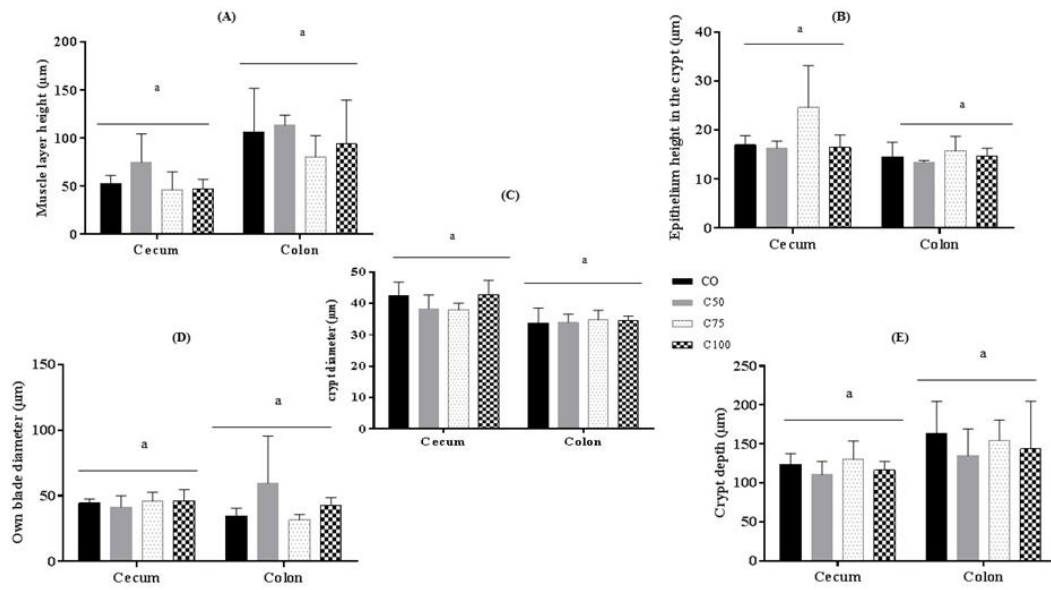


Figure 5. Effect of the curcumin transdermic gel on the colon and cecum of IL-10 KO mice with intestinal inflammation.

followed by the same letter on the same graph do not differ by the Newman Keuls post-hoc test at 5% probability. C0, control (vehicle); C50, transdermal gel containing 50 mg curcumin kg^{-1} body weight (BW); C75, transdermal gel containing 75 mg curcumin kg^{-1} BW; C100, transdermal gel containing 100 mg curcumin kg^{-1} BW.

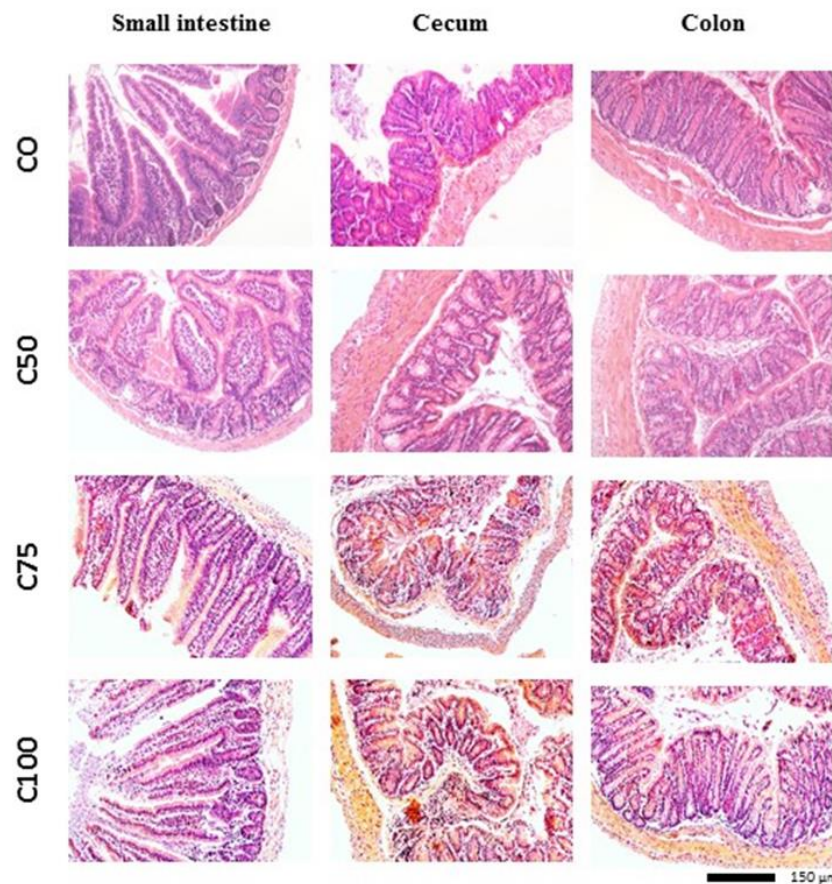


Figure 6. Photomicrographs representative of sections of the small intestine, colon and cecum treated with different doses of curcumin. C0, control (vehicle); C50, transdermal gel containing 50 mg curcumin kg^{-1} body weight (BW); C75, transdermal gel containing 75 mg curcumin kg^{-1} BW; C100, transdermal gel containing 100 mg curcumin kg^{-1} BW.

4. DISCUSSION

In the present study, C100 treatment attenuated weight loss, indicating an improvement in the morphological parameters of animals affected with IBD. Nutrient malabsorption is a common sign of IBD resulting from the reduction of the intestinal absorptive area, bile salt deficiency, bacterial overgrowth, gastrointestinal narrowing, and inflammation. These factors lead to compromised nutritional status, characterized by weight loss and lack of vitamins and minerals (e.g., iron, folic acid, vitamin B12, vitamin D, and calcium) (Jimenez & Gasche, 2019). Fat digestion and absorption can also be impaired in IBD. The intestinal surface is altered by inflammation, depletion of the circulating bile pool (as a result of bile acid malabsorption), or intestinal dysbiosis, resulting in deficiency of fat-soluble vitamins (Quigley, 2013).

About oxidative stress, we have to the imbalance between production and neutralization of free radicals, such as reactive oxygen (ROS) and nitrogen species (RNS), promotes oxidation

of biomolecules and consequent loss of biological function. Oxidizing molecules cause DNA damage, protein oxidation, lipid peroxidation, necrosis, and cell apoptosis (Stamler et al., 1997).

MDA is a biomarker of elevated intracellular ROS concentrations, indicating lipid peroxidation. An experimental study showed that IBD is associated with an increase in biomarkers of oxidative stress in colonic tissue and blood, such as lipid peroxidation products (Damiani et al., 2007). Oxidative stress plays a central role in cell damage. Defense and elimination mechanisms may be insufficient to deal with ROS overproduction (Schnaider et al., 2005). Curcumin, however, scavenges free radicals and inhibits lipid peroxidation, thereby protecting cellular macromolecules, such as DNA, from oxidative damage (Bianchi & Antunes, 1999).

Direct action of the nonenzymatic antioxidant (curcumin) was evidenced by the reduction in CAT activity in the small intestine and colon and SOD and GST activities in the colon. The synergistic effects of curcumin and endogenous antioxidants seemed to rebalance cellular redox homeostasis in mice with IBD, decreasing the need for the enzymes that compose the body's first line of antioxidant defense.

The antioxidant defense system of the human body consists of a series of antioxidant enzymes and numerous endogenous and exogenous antioxidant compounds that neutralize ROS (Khan et al., 2015; Lopez et al., 2016). Free radicals are formed by the catalytic action of enzymes during electron transfer processes in cellular metabolism and by exogenous factors. In IBD, ROS and RNS are generated via activation of inflammatory cells. Reactive species are often observed in early disease stages and are correlated with IBD severity and progression (Zhu & Li, 2012). Topical application of curcumin promoted ROS elimination through direct (detoxification of oxidative radicals) and possibly indirect (enhanced endogenous antioxidant enzyme activity) actions.

Studies have shown that intestinal epithelial cells produce high levels of ROS and RNS during infiltration of inflammatory cells (e.g., neutrophils and macrophages), characterizing a hallmark of IBD pathophysiology (Maloy & Powrie, 2011; Zhu & Li, 2012). Sivalingam et al. (2008) found that curcumin plays an important role in protecting mitochondria against oxidative stress and increasing glutathione levels. In an animal model of insulin resistance, curcumin contributed to the increase in glutathione, glutathione reductase, SOD, CAT, and peroxidase activities, favoring the antioxidant defense system (Panahi et al., 2018).

We did not observe a dose-dependent increase in enzyme activity, allowing us to infer that curcumin, whether at high or low doses, is effective in activating oxidative stress mediators

and enzymes. Our results confirm the antioxidant and anti-inflammatory effects of curcumin reported in the literature (Abrahams et al., 2019; Baradaran et al., 2020; Belhan et al., 2020; El-Naggar et al., 2019; Peres, Vargas & Souza, 2015).

In histomorphometric analysis, it was not possible to observe an improvement in intestinal inflammation with the treatment of gels of different concentrations of curcumin. However, CTG s do not act by worsening the disease stage, thus keeping the inflammatory process constant.

The depth of the crypt is indicative of the compensatory capacity or hyperplasia of epithelial cells due to a higher level of aggression to the morphological structure of the intestinal mucosa caused by inflammation. We have to reduce the height of the villi as a result of the increase in the rate of epithelial desquamation, which may result from the increase in the depth of the crypt, aiming to ensure the adequate rate of cell turnover and guarantee the replacement of cell losses in the apical region of the villi (Oetting et al., 2006). In our study, it is likely the absence of difference in the histological injury may be due to the exposure time to curcumin or we can infer that the own preservation of the mucosa with the decreasing of oxidative stress may induce the transcription of genes involved in the synthesis of glutathione by the intestinal mucosa. (Lutgendorff et al., 2009). There is also the reduction of the transcription factor linkage NF-kB to DNA, with consequential reduction of the expression of inflammatory mediators (Bai et al., 2006; Hegazy et al., 2010; Truusalu et al., 2008). The fact of the animal has not histologically worsened is already a gain, since these animals are very inflamed and tend to worsen their stage of the disease over time.

Preceding the change in tissue morphology, we have changes in biochemical, enzymatic and genetic parameters, in the most recent scientific literature, the frequency of IBD extra-intestinal manifestations (MEI) varies between 21-47% (Carvalho et al., 2018). The chronic inflammatory state of IBD is perceived as a set of aggressive cellular immune responses to a certain type of colonic bacterial flora. The susceptibility to the disease is conferred by certain genes that encode the immune responses triggered by environmental stimuli. Therefore, the pathogenesis of IBD and, possibly, its extra-intestinal manifestations, is based on a relationship between genetics, immune dysregulation, microbial flora and barrier dysfunction (Carvalho et al., 2018).

It allows us to infer that the higher the ratio of villus height to the crypt depth, the better the absorption of nutrients and the lower the energy losses with cell renewal. Thus, the greater the height of the villi and the lesser depth of the crypts in the small intestine, the better

absorption of nutrients and less energy losses with a rate of cell renewal (Liu et al., 2020). In the present study, we observed less weight loss in the C100 group, even though there was no statistical difference in villus and crypt, this group managed to maintain better nutrition, by optimizing the absorption of nutrients, reducing energy losses.

5. CONCLUSION

In conclusion this study, therefore, demonstrates the potential protective effects of the curcumin transdermal gel on the oxidative stress and can perform a significant role in the treatment of inflammatory bowel disease in the future, particularly as adjunctive therapy.

6. REFERENCES

- ABRAHAMS S, HAYLETT W L, JOHNSON, G, CARR J A, BARDIEN S. 2019. Antioxidant Effects of Curcumin in Models of Neurodegeneration, Ageing, Oxidative and Nitrosative Stress: A Review. *Neuroscience* 406: 1-21.
- AEBI, H. 1984. Catalase in vitro. *Methods in Enzymology*. 105: 121-106.
- ANDRADE G F, DE ALMEIDA C D G, ESPESCHIT A C R, DANTAS M I S, BENJAMIN L A, RIBEIRO S M R & MARTINO H S D. 2013. The addition of whole soy flour to cafeteria diet reduces metabolic risk markers in wistar rats. *Lipids in Health and Disease*. 12: 145.
- BAMIAS G, FILIDOU E, GOUKOS D, VALATAS V, ARVANITIDIS K, PANAGOPOULOU M, KOUKLAKIS G, DAIKOS G, LADAS S & KOLIOS G. 2017. Crohn's disease-associated mucosal factors regulate the expression of TNF-like cytokine 1A and its receptors in primary subepithelial intestinal myofibroblasts and intestinal epithelial cells. *Translational Research*. 180:118–130
- BARADARAN S, HAJIZADEH MOGHADDAM, A, KHANJANI JELODAR, S & MORADI-KOR, N. 2020. Protective Effects of Curcumin and its Nano-Phytosome on Carrageenan-Induced Inflammation in Mice Model: Behavioral and Biochemical Responses. *Journal of Inflammation Research*. 13: 45-51.
- BARBOSA K B F, COSTA N M B, ALFENAS R C G, DE PAULA S O, MINIM V P R, BRESSAN J. 2010. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. *Rev. Nutr.* 23: 629-643.
- BASTOS C C C, DE ÁVILA P H M, FILHO E X S, DE ÁVILA R I, BATISTA A C, FONSECA S G, LIMA E M, MARRETO R N, DEMENDONÇA E F, VALADARES M C. 2016. Use of *Bidens pilosa* L. (Asteraceae) and *Curcuma longa* L. (Zingiberaceae) to treat intestinal mucositis in mice: Toxicopharmacological evaluations. *Toxicol Rep.* 3, 279-287.

- BELHAN S, YILDIRIM S, HUYUT Z, ÖZDEK U, OTO G & ALGÜL, S. 2020. Effects of curcumin on sperm quality, lipid profile, antioxidant activity and histopathological changes in streptozotocin-induced diabetes in rats. *Andrologia*. e13584.
- BIANCHI M L P & ANTUNES L M G. 1999. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. *Rev. Nutr., Campinas*. 12: 123-130.
- BIONDO-SIMÕES M L P, MANDELLI K K, PEREIRA M A C & FATURI J. L. 2003. Opções terapêuticas para as doenças inflamatórias intestinais: revisão. *Rev Bras Coloproct* 23: 172-182.
- BYRNE F R. & VINEY J L. 2006. Mouse models of inflammatory bowel disease. *Curr Opin Drug Discov Devel*. 9: 207-217.
- CARVALHO A C G, FONSECA A M S, COSTA E M R M, LIRA, S A J C & REIS A C C G G. 2018. Inflammatory bowel disease with erythema nodosum as the initial manifestation—two clinical cases. *Scientia Medica*. 28: 31062.
- DAMIANI C R, BENETTON C A, STOFFEL C, BARDINI K C, CARDOSO V H, DI GIUNTA G, PINHO, R A, DAL-PIZZOL F & STRECK E L. 2007. Oxidative stress and metabolism in animal model of colitis induced by dextran sulfate sodium. *J. Gastroenterol Hepatol*. 22: 1846-1851.
- DEOGADE S C & GHATE S. 2015. Curcumin: therapeutic applications in systemic and oral health. *International Journal of Biological & Pharmaceutical Research*. 6: 281-290.
- DEVASSY J G., NWACHUKWU I D & JONES P J H. 2015. Curcumin and cancer: barriers to obtaining a health claim. *Nutrition Reviews*. 73: 155-165.
- DOBROWOLSKI P, HUET P, KARLSSON P, ERIKSSON S, TOMASZEWSKA E, GAWRON A & PIERZYNOWSKI S G. 2012. Potato fiber protects the small intestinal wall against the toxic influence of acrylamide. *Nutrition*. 28: 428-435.
- MYUNG S.-K., JU W, CHO B, OH S.-W, PARK S M. & KOO B K.. 2013. Efficacy of vitamin and antioxidant supplements in prevention of cardiovascular disease: systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials. *Bmj*. 346: F10.
- EL-NAGGAR M E, AL-JOUFI F, ANWAR M, ATTIA M.F & EL-BANA M A. 2019. Curcumin-loaded PLA-PEG Copolymer Nanoparticles for Treatment of Liver Inflammation in Streptozotocin-induced Diabetic Rats. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 177: 389-398.
- GREUTER T & VAVRICKA S R. Extraintestinal manifestations in inflammatory bowel disease - epidemiology, genetics, and pathogenesis. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*. 2019. 13: 307–317.

- HADDAD J J. 2002. Antioxidant and prooxidant mechanism in the regulation of redox(y)-sensitive transcription factors. *Cell Signal*. 14: 879-97.
- JAMEL, M. J., PEREIRA, L. D. P. M., MELLO, N. B., ELEUTHÉRIO, E. C. A., & SCHANAIDER, A. Blood carbonyl protein measurement as a specific oxidative stress biomarker after intestinal reperfusion in rats. *Acta cirurgica brasileira*. v. 25, p.59-62. 2010.
- JASSEN-HEINIGER Y M, POYNTER M E & BAEURLE P A. 2000. Recent advances towards understanding redox mechanism in the activation of nuclear factor kB. *Free Rad Biol Med*. 28: 1317-327.
- JIMENEZ K M & GASCHÉ C. 2019. Management of Iron Deficiency Anaemia in Inflammatory Bowel Disease. *Acta Haematologica*. 140: 30-36.
- KHAN M, AKHTAR N, SHARMA V & PATHAK K. 2015. Product Development Studies on Sonocrystallized Curcumin for the Treatment of Gastric Cancer. *Pharmaceutics*. 7: 43-63.
- KEUBLER L M, BUETTNER M, HÄGER C & BLEICH A. A multihit model: colitis lessons from the Interleukin-10-deficient mouse. *Inflamm Bowel Dis*. 2015. 21:1967–1975.
- KOCAADAM B & ŞANLIER, N. 2015. Curcumin, an active component of turmeric (*Curcuma longa*), and its effects on health. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 57: 2889-2895.
- KOBOZIEV I, KARLSSON F, ZHANG S & GRISHAM M B. 2011. Pharmacological intervention studies using mouse models of the inflammatory bowel diseases. *Inflammatory Bowel Diseases*, 17(5): 1229–1245.
- KOHN H I & LIVERSEDGE M. 1944. On a new aerobic metabolite whose production by brain is inhibited by apomorphine, emetine, ergotamine, epinephrine, and menadione. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 82: 292-300.
- LEVINE R L, GARLAND D, OLIVER C N, AMICI A, CLIMENT I, LENZ A G, AHN B W, SHALTIEL S & STADTMAN E R. 1990. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol*. 186: 464-478.
- LIU A, GONG Z, LIN L, XU W, ZHANG T, ZHANG S, LI Y, CHEN J & XIAO W. 2020. Effects of L-theanine on glutamine metabolism in enterotoxigenic *Escherichia coli* (E44813)-stressed and non-stressed rats. *Journal of Functional Foods*. 64: 103670.
- LOPEZ S, JULIETA N, LOARCA-PIÑA G, CAMPOS-VEJA R, GAYTÁN MARTÍNEZ M., MORALES SÁNCHEZ E, ESQUERRA-BRAUER J M., GONZALEZ-AGUILAR G A & ROBLES SÁNCHEZ M. 2016. The Extrusion Process as an Alternative for Improving the

- Biological Potential of Sorghum Bran: Phenolic Compounds and Antiradical and Anti-Inflammatory Capacity. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2016: 8.
- LUTGENDORFF F, NIJMEIJER R M, SANDSTRÖM P A, TRULSSON L M, MAGNUSSON K E, TIMMERMAN H M L, MINNEN P V, RIJKERS G T, GOOSZEN H G, AKKERMANS L M A & SÖDERHOLM J D. 2009. Probiotics Prevent Intestinal Barrier Dysfunction in Acute Pancreatitis in Rats via Induction of Ileal Mucosal Glutathione Biosynthesis. *PLoS ONE*, 4: e4512.
- MAGRO F, LANGNER C, DRIESSEN A, ENSARI A, GEBOES K, MANTZARIS G J, VILLANACCI V, BECHEANU G, BORRALHO NUNES P, CATHOMAS G, FRIES W, JOURET-MOURIN A, MESCOLI C, DE PETRIS G, RUBIO C.A, SHEPHERD N A, VIETH M & ELIAKIM R. 2013. European consensus on the histopathology of inflammatory bowel disease. *Journal of Crohn's and Colitis*. 7: 827-851.
- MALOY K.J & POWRIE, F. 2011. Intestinal homeostasis and its breakdown in inflammatory bowel disease. *Nature*. 474: 298-306.
- MANDALARI G, BISIGNANO C, GENOVESE T, MAZZON E, WICKHAM M. S. J, PATERNITI I & CUZZOCREA S. 2011. International Immunopharmacology Natural almond skin reduced oxidative stress and inflammation in an experimental model of inflammatory bowel disease. *International Immunopharmacology*. 11: 915-924.
- MANGANARIS G.A, GOULAS V, VICENTE A R & TERRY L A. 2014. Berry antioxidants: small fruits providing large benefits. *J Sci Food Agric*. 94: 825-33.
- MARANHÃO D D A, VIEIRA A & CAMPOS T. 2015. Características e diagnóstico diferencial das doenças inflamatórias intestinais. *J. Bras. Med*. 103: 9-15.
- MARKLUND S. 1985. Pyrogallol autooxidation. In: *Handbook of Methods for Oxygen Radical Research*. Boca Raton: CRC PRESS, p. 243-247.
- MIZOGUCHI A & MIZOGUCHI E. 2010. Animal models of IBD: linkage to human disease. *Curr. Opin. Pharmacol*. 10: 578-587.
- MONTON C, LUPRASONG C & CHAROENCHAI L. 2019. Convection combined microwave drying affect quality of volatile oil compositions and quantity of curcuminoids of turmeric raw material. *Rev. bras. farmacogn*. 29: 434-440.
- MOURA F A, DE ANDRADE K Q, DOS SANTOS, J C F, ARAÚJO O R P & GOULART M O F. 2015. Antioxidant therapy for treatment of inflammatory bowel disease: Does it work? *Redox Biology*. 6: 617-639.

- NENNIG, S. E., & SCHANK, J. The role of NF κ B in drug addiction: beyond inflammation. **Alcohol and Alcoholism**. v.52, n.2, p.172-179. 2017
- NEURATH M.F. 2014. Cytokines in inflammatory bowel disease. *Nature Reviews Immunology*. 14: 329-342.
- NOVELLI E. L B, DINIZ, Y S, GALHARDI, C M, EBAID G M X, RODRIGUES H G, MANI F, FERNANDES A A H, CICOGNA A C & NOVELLI FILHO J L V B. 2007. Anthropometrical parameters and markers of obesity in rats. *Laboratory Animals*. 41: 111-119.
- OETTING L L, UTIYAMA C E, GIANI P A, RUIZ U S & MIYADA V S. 2006. Efeitos de extratos vegetais e antimicrobianos sobre a digestibilidade aparente, o desempenho, a morfometria dos órgãos e a histologia intestinal de leitões recém-desmamados. *Revista Brasileira de Zootecnia*. 35: 1389-1397.
- OHNO M, NISHIDA A, SUGITANI Y, NISHINO K, NATOMI O, SUGIMOTO M, KAWAHARA M & ANDOH A. 2017. Nanoparticle curcumin ameliorates experimental colitis via modulation of gut microbiota and induction of regulatory T cells. *PLoS ONE*. 12: e0185999.
- PANAHI Y, AHMADI Y, TEYMOURI M., JOHNSTON T P & SAHEBKAR A. 2018. A. Curcumin as a potential candidate for treating hyperlipidemia: A review of cellular and metabolic mechanisms. *J Cell Physiol*. 233: 141-152.
- PERES A S, VARGAS E G A & SOUZA V R S. 2015. Propriedades funcionais da cúrcuma na suplementação nutricional. *Rev. Inter. Pens. Cien*. 1: 15.
- PRASAD S, TYAGI, A K & AGGARWAL B B. 2014. Recent Developments in Delivery, Bioavailability, Absorption and Metabolism of Curcumin: the Golden Pigment from Golden Spice. *Cancer Research and Treatment: Official Journal of Korean Cancer Association*. 46: 2-18.
- QUIGLEY E M M. 2013. Gut Bacteria in Health and Disease. *Gastroenterol Hepatol*. 9: 560-569.
- RAUHMANN I & MACNEE, W. 2000. Regulation of redox glutathione levels and gene transcription in lung inflammation: therapeutic approaches. *Free Rad Biol Med*. 18: 1405-420.
- SADEGHI A, ROSTAMIRAD A, SEYYEDEBRAHIMI S & MESHKANI R. 2018. Curcumin ameliorates palmitate-induced inflammation in skeletal muscle cells by regulating JNK/NF- κ B pathway and ROS production. *Inflammopharmacology*. 26: 1265-1272.
- SAMPEY B P, VANHOOSE A M., WINFIELD H M., FREEMERMAN, A J, MUEHLBAUER M. J, FUEGER P T, NEWGARD C B & MAKOWSKI, L. 2011. Cafeteria

diet is a robust model of human metabolic syndrome with liver and adipose inflammation: comparison to high-fat diet. *Obesity (Silver Spring)*. 19: 1109-1117.

SCHANAIDER A, MENEZES V J M T, BORCHARDT A C, OLIVEIRA P L & MADI, K. 2005. Oxidized tissue proteins after intestinal reperfusion injury in rats. *Acta Cir. Bras.* 20: 434-436.

SIVALINGAM N, BASIVIREDDY J, BALASUBRAMANIAN K A & JACOB M. 2007. Curcumin attenuates indomethacin-induced oxidative stress and mitochondrial dysfunction. *Archives of Toxicology*. 82: 471-481.

SOARES E. R, MONTEIRO E B, SILVA R C, BATISTA A, SOBREIRA F, MATTOS, T, COSTA C A & DALEPRANE J B. 2015. Compostos bioativos em alimentos, estresse oxidativo e inflamação: uma visão molecular da nutrição. *Revista Hospital Universitário Pedro Ernesto*. 14: 64-72.

STAMLER J S, TOONE E J, STUART A, LIPTON S A, SUCHER N J. 1997. (S)NO signals: translocation, regulation, and a consensus motif. *Neuron*. 18: 691-696.

STROBEL N A, FASSETT, R. G, MARSH, S A & COOMBES J S. 2011. Oxidative stress biomarkers as predictors of cardiovascular disease. *International journal of cardiology*. 147: 191-201.

TORRES J A P, SANTANA R M, TORRES F A P, MOURA, A R & TORRES NETO J R. 2011. Doenças inflamatórias intestinais no Hospital Universitário da Universidade Federal de Sergipe: manifestações extraintestinais. *Revista Brasileira de Coloproctologia*. 31: 115-119.

TREVISANI M, SIEMENS J, MATERAZZI S, BAUTISTA D M., NASSINI R, CAMPI B, IMAMACHI N, ANDRE E, PATACCHINI R., COTTRELL G S, GATTI R, BASBAUM A I, BUNNETT N W, JULIUS D & GEPPETTI P. 2007. 4-Hydroxynonenal, an endogenous aldehyde, causes pain and neurogenic inflammation through activation of the irritant receptor TRPA1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 104: 13519-13524.

TZANKOVA V, ALUANI D, YORDANOV Y, KONDEVA-BURDINA M, PETROV P, BANKOVA V, SIMEONOVA R, VITCHEVA V, ODJAKOVD F, APOSTOLOV A, TZANKOV B & YONCHEVA K. 2019. Micellar propolis nanoformulation of high antioxidant and hepatoprotective activity. *Rev. bras. farmacogn.* 29: 364-372.

VECCHI BRUMATTI L, MARCUZZI A., TRICARICO P M., ZANIN V, GIRARDELLI, M. & BIANCO A M. 2014. Curcumina e doença inflamatória intestinal: potencial e limites de tratamentos inovadores. *Moléculas*. 19: 21127-21153.

VEZZA T, RODRÍGUEZ-NOGALES A, ALGIERI, F, UTRILLA M, RODRIGUEZ-CABEZAS M. & GALVEZ J. 2016. Flavonoids in Inflammatory Bowel Disease: A Review. *Nutrients*. 8: 211.

YADAV S K, SAH A K, JHA R K, SAH P & SHAH D K. 2013. Turmeric (curcumin) remedies gastroprotective action. *Pharmacognosy Review*. 7: 42-46.

ZHU H & LI Y R. 2012. Oxidative stress and redox signaling mechanisms of inflammatory bowel disease: updated experimental and clinical evidence. 2012. *Experimental Biology and Medicine*. 237: 474-480.

ARTIGO 2**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA FORMULAÇÃO DE CURCUMINA EM GEL TRANSDÉRMICO *IN VITRO* QUANTO A VIABILIDADE, CAPACIDADE CITOPROTETORA, ANTIOXIDATIVA E DE PROTEÇÃO *IN VIVO* DA MORFOLOGIA INTESTINAL****EVALUATION OF THE EFFECTS *IN VITRO* OF TRANSDERMIC GEL CURCUMIN FORMULATION ON VIABILITY, CYTOPROTECTIVE, ANTIOXIDATIVE AND *IN VIVO* PROTECTION CAPACITY OF INTESTINAL MORPHOLOGY****ABSTRACT**

As doenças inflamatórias intestinais (DII), representadas principalmente pela doença de Crohn (DC) e colite ulcerativa (UC), apresentam prevalência crescente em todo o mundo. A Curcumina é o principal pigmento curcuminóide farmacologicamente ativo na *Curcuma longa* e atua modulando várias vias de sinalização celular, produzindo efeitos antiinflamatórios, antitumorais, antioxidantes e imunomoduladores. O desenvolvimento de um gel de açafrão para administração transdérmica visa garantir uma ação sistêmica mais efetiva desse fitofármaco e aumentar a adesão do paciente ao tratamento devido à sua facilidade de administração. O objetivo do estudo foi avaliar o efeito da curcumina e do gel transdérmico da curcumina (GTC) no estresse oxidativo e na inflamação intestinal em camundongos knockout para IL-10. Foram realizadas *in vitro* os ensaios de determinação da atividade antioxidante por DPPH, o ensaio de viabilidade celular, a avaliação da viabilidade celular após indução ao estresse oxidativo com H₂O₂ e a avaliação da capacidade citoprotetora da curcumina. *In vivo*, camundongos fêmeos foram divididos em cinco grupos: controle (CN) e três tratamentos (C100: 100mg, C200: 200mg e C400: 100mg de Curcumina por Quilograma de Peso Corporal) e foram realizadas análises dos níveis de peroxidação lipídica e estresse oxidativo e avaliação histomorfométricas do intestino, colón e ceco. A curcumina apresentou potencial antioxidante em todas as concentrações testadas e que a concentração de curcumina é diretamente proporcional à ação antioxidante. Nas concentrações mais altas de curcumina, houve uma redução na viabilidade celular. Os tratamentos com maiores concentrações de curcumina, não foram capazes de gerar alterações no estado de oxidação-redução. Os GTC foram capazes de reduzir no intestino delgado as atividades de SOD e CAT e aumentar as atividades de GST no grupo C200. No colón tivemos maior concentração das moléculas antioxidantes GST e do grupo ON C400. Na histologia, o GTC promoveu o relaxamento da camada muscular, no intestino delgado de todos os animais tratados, no colón dos animais C100 e C200 e no ceco dos animais C100. No ceco,

o GTC aumentou a profundidade da cripta nos grupos C200 e C400. O presente estudo demonstrou que o CTG tem efeito protetor sobre o estresse oxidativo e melhora morfológica em camundongos knockout para IL-10.

Keywords: intestinal inflammation, oxidative stress, curcumin, antioxidants, transdermal gel.

1. INTRODUÇÃO

A doença inflamatória intestinal (DII), representadas principalmente pela doença de Crohn (CD) e colite ulcerativa (UC), mostram uma prevalência crescente em todo o mundo (GRAHAM & XAVIER, 2020; MARTINO et al., 2020).

A maior incidência e prevalência da DII são em países industrializados, embora estejam aumentando nos países em desenvolvimento e seguem padrões geográficos de industrialização, que têm sido associadas ao aumento da ingestão de gordura total, carne processada e excesso de carboidratos simples (KILBY et al., 2019; SCARANO et al., 2018). Além disso, estamos testemunhando uma mudança no perfil de idade dos pacientes com DII. Os dados epidemiológicos afirmam claramente que existe uma incidência crescente de DII entre a população idosa (KRZYTEK-KORPACKA et al., 2020; ARNOTT, ROGLER & HALFVARSON, 2018).

A DII se desenvolve a partir de uma combinação de suscetibilidade genética e fatores ambientais que provocam uma resposta inflamatória deletéria, com um curso da doença caracterizado por manifestação de episódios de inflamação remitentes e recidivantes (AXELRAD et al., 2021). Não há cura eficaz para DII, porém medicamentos moduladores imunológicos, anti-inflamatórios e anticorpos monoclonais são frequentemente usados no tratamento (SCARANO et al., 2018). Muitos desses tratamentos estão associados a riscos aumentados de infecções nos pacientes devido a uma acentuada supressão da resposta imune (COELHO et al., 2020; RUBIN et al., 2020).

Relatórios recentes, documentam o uso de fitoquímicos naturais na DII que possuem atividade anti-inflamatória e antioxidante. O aumento da utilização de espécies vegetais no tratamento das mais diversas patologias, acompanha a humanidade. Isso se deve ao potencial terapêutico dos constituintes fitoquímicos dos espécimes vegetais, que se apresentam como fonte em potencial para a preparação de novos compostos (CAVALCANTE, BARBOSA & SILVA, 2021; DENT & MATOBA, 2020). Além disso, o envolvimento de radicais livres em doenças inflamatórias justifica a indicação de diversas plantas medicinais, que reduzem o estresse oxidativo pela capacidade de eliminação das espécies reativas de oxigênio (ROS). A investigação de produtos naturais para tratamento da DII é de grande importância, pois está relacionado a uma melhora na qualidade e vida dos pacientes, por apresentarem menores efeitos colaterais em relação ao tratamento convencional (KHARE et al., 2020). Evidências indicaram que a curcumina pode ser usada como candidato terapêutico sozinho ou em combinação com

outros agentes terapêuticos no tratamento de DII (SAMARGHANDIAN et al., 2017; CHIN, 2016).

A curcumina, possui efeitos comprovados cientificamente, como a redução da inflamação em casos de artrite, prevenção de arteriosclerose, desordens respiratórias e gastrointestinais, efeitos hepatoprotetores, afecções da pele como psoríase e eczema, prevenção de câncer e capacidade antioxidante. A capacidade anti-inflamatória, em parte, é devida à inibição da síntese de prostaglandinas inflamatórias (LIMA et al., 2019). Estudos pré-clínicos sugeriram que a curcumina exerce seus efeitos farmacológicos por meio do direcionamento de uma variedade de vias celulares e moleculares que estão envolvidas na patogênese da DII (FALLAHI et al., 2021).

Uma possível barreira para a administração de medicamentos naturais de forma convencional, oral, como a curcumina, é restrita devido à sua pouca solubilidade, permeabilidade e biodisponibilidade (KHARE et al., 2020). Estudos demonstram que a curcumina oral em camundongos nocaute de IL-10, melhora a colite espontânea ao ser eficaz na redução dos níveis de citocinas inflamatórias e possui efeitos anti-inflamatórios mediados por uma produção reduzida de potentes citocinas pró-inflamatórias da mucosa (UNG et al., 2010). Em humanos ou em roedores, a curcumina quando é administrada por via oral, ela sofre conjugação no fígado, formando glucuronídeos e sulfato de curcumina. Essa reação produz um forte conjugado lipofílico, o qual é menos estável do que a sua forma não conjugada, que é, então, menos absorvida pelo organismo, sendo excretado pelas fezes (AGGARWAL et al., 2009; PFEIFFER et al., 2007).

O nosso grupo de pesquisa (ARAUJO, 2021, em prelo) evidenciou o potencial efeito protetor do GTC nas concentrações 50, 75 e 100 mg de curcumina por quilo de peso corporal sobre o estresse oxidativo. Demonstrou que a resposta do GTC não é dose dependente, e na concentração de 100 mg de curcumina o gel é capaz de reverter a perda de peso causada pela DII. Assim, o presente estudo tem como objetivo testar diferentes concentrações de gel transdérmico de curcumina, quanto à capacidade antioxidativa e na melhora dos parâmetros histomorfométricos em modelo de DII.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Determinação da atividade antioxidante por DPPH

A atividade antioxidante da curcumina foi determinada através da capacidade dos antioxidantes presentes nas amostras em sequestrar o radical estável DPPH. O ensaio de DPPH foi realizado de acordo com Roesler et al. (2007) com algumas adaptações, no qual a curcumina foram previamente dissolvidas em metanol e 50 µL de cada diluição foi misturado a 250 µL de solução DPPH (0.1 mmol/L) em microplaca de 96 poços.

O controle da reação (reagente DPPH) foi preparado de acordo com o procedimento descrito anteriormente, sem adição de composto e utilizando o metanol para corrigir a linha de base. A curcumina, foi pesada (1 mg) e diluída em 1 ml de metanol. A partir dessa solução, foram preparadas soluções de 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175 e 200 µg/ml para cada composto, que foram as concentrações utilizadas no teste. O mesmo foi feito para os controles positivos (padrões), utilizando-se ácido ascórbico, rutina e Butylated Hydroxytoluene – BHT. A reação foi mantida ao abrigo da luz por um período de 30 minutos, e posteriormente, as absorbâncias foram determinadas a 517 nm em um leitor de microplacas Elisa Multiskan™ FC Microplate Photometer (Thermo Scientific™). Os experimentos foram realizados em triplicata. A capacidade de sequestro de radicais livres foi calculada da seguinte forma:

$$\% \text{ inibição} = ((A_{\text{DPPH}} - A_{\text{composto}}) / A_{\text{DPPH}}) * 100 \quad \text{onde:}$$

A_{DPPH} : absorbância da solução de DPPH;

A_{composto} : absorbância da amostra.

2.2 Ensaio de viabilidade celular

O ensaio de viabilidade celular foi avaliado pelo método de redução do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio (MTT), seguindo a metodologia descrita por Kim (2011) com algumas adaptações.

Células de macrófagos RAW 264.7 foram cultivadas em placas de 96 poços a uma densidade de 2×10^4 células/poço em 200 µL de meio de cultura *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) suplementado com 10% de soro fetal bovino e 100 U/ml de estreptomicina/penicilina em estufa a 37°C e 5% de CO₂. Após um período de 24 horas de incubação, o meio foi substituído pela curcumina em diferentes concentrações 6,25, 12,5, 25, 50, 100 e 200 µg/ml em meio de cultura + 0,4% de dimetilsulfóxido (DMSO), e a incubação continuou pelas próximas 22 horas. O controle (C) (100% de crescimento) foram células cultivadas apenas em meios de cultura. Foi feito também o controle do solvente (CS) utilizando

meio de cultura + 0,4% de DMSO. Após este período de incubação, retirou-se 50 µL do sobrenadante e adicionou-se 50 µL de solução de MTT (0,5 mg/ml) a cada poço, e as células foram incubadas novamente na estufa por um período de 2 horas. Após este período, o sobrenadante foi retirado e 150 µL de DMSO foram adicionados aos poços.

A absorbância foi lida em um Leitor de Microplaca Elisa Multiskan Ascent (Thermo Labsystems, Franklin, MA, EUA) ajustado para 570 nm. Os experimentos foram realizados em triplicatas.

2.3. Avaliação da viabilidade celular após indução ao estresse oxidativo com H₂O₂

O H₂O₂ foi utilizado para a indução do estresse oxidativo como descrito por BALEKAR et al. (2012) e PONNUSAMY et al. (2015). O teste de viabilidade celular foi conduzido de acordo com a metodologia descrita no tópico 8.2.2, onde avaliou-se diferentes concentrações de H₂O₂ (0,125; 0,25; 0,5; 1; 2 e 4 mM) em meio de cultura. O controle (100% de crescimento) foi constituído de células cultivadas apenas em meio de cultura. Esta análise foi realizada para determinar a concentração que reduziria a viabilidade celular em no mínimo 80% após 24 horas de exposição. Os experimentos foram realizados em triplicatas.

2.4. Avaliação da capacidade citoprotetora da curcumina *in vitro*

Células de macrófagos RAW 264.7 foram cultivadas em placas de 96 poços a uma densidade de 2x10⁴ células/poço em 200 µL de meio de cultura DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino e 100 U/ml de estreptomicina/penicilina em estufa a 37°C e 5% de CO₂. Após um período de 24 horas de incubação, o meio foi substituído pela curcumina em diferentes concentrações 6,25, 12,5, 25, 50, 100 e 200 µg/ml em meio de cultura + 0,4% de dimetilsulfóxido (DMSO), e a incubação continuou pelas próximas 24 horas. O controle (100% de crescimento) foi constituído de células cultivadas apenas em meio de cultura. Foi feito também um controle utilizando meio de cultura + 0,4% de DMSO. Após este período, o controle utilizando meio de cultura + 0,4% de DMSO e os tratamentos utilizando diferentes concentrações de curcumina foram expostos ao H₂O₂ na concentração de 2 mM por um período de 3 horas. A avaliação da viabilidade celular foi realizada por meio do teste de MTT como descrito no item 8.2.2. Os experimentos foram realizados em triplicatas.

2.5. Preparo do gel transdérmico de curcumina (GTC) para ensaio biológico *in vivo*

Para desenvolvimento dos três géis transdérmico, a curcumina (Sigma-Aldrich®) foi incorporado ao gel de permeação transdérmica Pentravan® foi realizada adicionando-se a 25, 50 e 100 g de curcumina no gral de vidro, seguida da adição, aos poucos, do Pentravan® e agitação vigorosa com pistilo para mistura dos componentes. Foram produzidos géis

transdérmicos com concentrações de 25 mg de curcumina/g de Pentravan[®]; 50mg de curcumina/g de Pentravan[®] e 100mg de curcumina/g de Pentravan[®]. Todos os géis foram desenvolvidos para que volume de gel aplicado nos animais não variasse, reduzindo ao máximo o erro de resultado por absorção.

2.6. Ensaio Biológico *in vivo*

2.6.1. Animais/Desenho experimental

Foram utilizados 20 camundongos fêmeas C57BL/6 (IL10^{-/-}) (classe Mammalia, ordem: Rodentia, família Muridae e espécie *Mus musculus*), recém-desmamados, com 28 dias de idade. A escolha dos animais utilizados no experimente foi baseado em modelo já descrito na literatura, para estudo de doença inflamatória intestinal (NEURATH, 2014; KOBOZIEV et al., 2011; MIZOGUCHI & MIZOGUCHI, 2010; UNG et al.,2010; BYRNE & VINEY, 2006). Dessa forma, os animais foram mantidos até o 60º dia de idade em caixas de polietileno, consumindo ração comercial (Presence/InVivo[®] Nutrição Animal) e água destilada *ad libitum*. A temperatura da sala de experimentação foi controlada em 22°C ± 3°C, com ciclo claro/escuro de 12 horas. Após esse período, os animais adultos jovens em fase inicial de DII, foram alocados em gaiolas de aço inoxidável individuais, em ambiente com temperatura controlada de 22°C ± 3°C, com ciclo de luz de 12 horas.

Os animais foram divididos em 4 grupos experimentais: 1) Controle Positivo – animais doentes (veículo via transdérmica n=5); 2) C100 (veículo + curcumina 100mg/Kg de peso do animal n=5); 3) C200 (veículo + curcumina 200mg/Kg de peso do animal n=5) e 4) C400 (veículo + curcumina 400mg/Kg de peso animal n=5). Os animais receberam 80 mg por dia de gel transdérmico, sendo as quantidades iguais em todos os grupos experimentais.

A distribuição dos animais em cada grupo experimental foi realizada de forma randomizada, atendendo à recomendação da AOAC (1997). O esquema de randomização dos animais foi gerado utilizando-se o software online Reserch Randomizer[®] disponível no site <<https://www.randomizer.org/>>. Em seguida, os animais foram tricomizados na região dorsal distal, em uma área de 2 cm².

Ao final do experimento, os camundongos foram colocados em jejum por 12 horas, em seguida foram anestesiados (com a utilização de Isoflurano 100%, Isoforine, Cristália[®], por inalação em câmara fechada, conforme resolução 714, de 20 de julho de 2002) e submetidos à eutanásia por punção cardíaca do sangue. O intestino foi removido inteiro e dissecado em três regiões: intestino delgado, ceco e cólon. Uma porção foi imersa em solução fixadora de Carnoy,

para posteriores análises histopatológicas e outra foi armazenada à temperatura de -80°C para análises do estresse oxidativo e defesa antioxidante.

Todos os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com o Comitê de Ética em Pesquisa Animal da Universidade Federal de Viçosa, Brasil (número de aprovação 41/2019).

2.7. Medidas biométricas

Foi aferido o peso dos animais no início e ao final do experimento, e o ganho de peso determinado pela diferença do peso final e do pelo peso inicial. O índice de massa corporal (IMC) foi obtido pela relação entre o peso e o quadrado do comprimento naso-anal. O intestino delgado, cólon e ceco foram pesados e comparadas as suas médias entre os grupos experimentais.

2.8. Análise dos níveis de peroxidação lipídica e estresse oxidativo

2.8.1. Preparo do homogeneizado

Foram preparados os homogenatos das amostras do intestino delgado e cólon para a avaliação do estresse oxidativo. Os órgãos foram pesados (100 mg de cada segmento), triturados em microtubos e em seguida adicionadas de 1000 μL de tampão fosfato 1M (pH 7,4). Os tubos foram centrifugados a 10.000 $\times g$ por 10 min a 4°C e o sobrenadante coletado e armazenado a -80°C .

2.8.2. Concentração de malondialdeído (MDA)

As concentrações de MDA foram determinadas por meio do ensaio de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) (KOHN & LIVERSEDGE, 1944). Os valores finais foram calculados usando uma curva padrão e o reagente N-oxil-2,2,2,6,6-tetrametilpiperidina (TMPO). Os resultados são expressos como nmol de MDA por miligrama de proteína (nmol de MDA/mg de proteína).

2.8.3. Concentração de Nitrito

A concentração do indicador indireto do óxido nítrico NO (Nitrito) foi determinada em homogenatos de fígado usando a reação de Griess como uma medida indireta da produção de NO (Green et al., 1982). Uma curva padrão foi preparada pela adição de padrão de nitrito de sódio e tampão. Após a incubação, a absorbância foi medida a 570 nm em um leitor Thermo Scientific-Multiskan™ GO (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA).

2.8.4. Atividade da superóxido dismutase (SOD)

A atividade da SOD foi expressa em unidades relativas (U), com uma unidade de SOD definida como a quantidade de enzima que inibe a taxa de oxidação do pirogalol em 50%. A análise foi realizada em um espectrofotômetro (Multiskan Go, Thermo Fisher Scientific) a 570 nm, e os resultados são expressos como U de SOD / mg de proteína (Marklund, 1985).

2.8.5. Atividade da catalase (CAT)

A determinação da atividade da enzima catalase é baseada na sua capacidade de clivar o peróxido de hidrogênio (H₂O₂) em água e oxigênio molecular, conforme descrito por AEBI (1984). Para a atividade da catalase foi calculada o delta das absorvâncias obtidas nas medições (absorvância no tempo 0 - absorvância aos 60 s), de acordo com a lei de Lambert Beer. A atividade enzimática foi registrada em U catalase/mg de proteína.

2.8.6 Atividade da Glutathione Transferase (GST)

A avaliação da atividade da GST é através do CNDB (1-cloro2,4-dinitrobenzeno; MW 202,6) que é metabolizado pela GST conjugado à GSH, resultando no aumento de absorvâncias (340nm). (HABIG; PABST & JAKOBY, 1976). Foram medidas as absorvâncias das amostras em triplicatas a 0, 30, 60 e 90s. Os resultados foram registados em $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$ de proteína.

2.9. Análises histomorfométricas do intestino, colón e ceco

O intestino delgado, colón e o ceco foram desidratados em soluções crescentes de etanol e xileno e incluídos em parafina. Foi utilizado um micrótomo rotativo semi-automático (Leica® RM2255) e navalhas de aço. Foram obtidos cortes semi seriados de 5 μm de espessura. Foram coradas com Hematoxilina e Eosina (HE). As lâminas (BioGlass®) foram montadas com o meio de Entellan (Merck, Frankfurt, Germany) e analisadas em microscópio de luz (Nikon Phase Contrast 0,90 Dry®, Japão). Foram capturadas as imagens na câmara digital DIGI-PRO 5.0 M por meio de Software Micrometrics SE Premium (Accu-Scope®). As análises morfométricas foram feitas com auxílio do software Image-Pro Plus (versão 4.0.5.29, Media Cybernetics Inc.). A análise histomorfométrica foi realizada segundo Bastos et al (2016) e Drobowski et al (2012) com alterações necessárias. No intestino delgado foram feitas as medidas: a) altura da camada muscular; b) altura do epitélio na vilosidade; c) altura do epitélio na cripta; d) diâmetro da cripta; e) diâmetro da vilosidade; f) altura da vilosidade. E no ceco e colón, diante da diferença fisiológica, foram aferidos: a) altura da camada muscular; b) altura do epitélio na cripta; c) diâmetro da cripta; d) diâmetro da lâmina própria; e) profundidade da

cripta. Foram feitas as medidas em 5 pontos diferentes, de cada parâmetro, por animal. Os resultados para cada animal (repetição) foram apresentados como médias das medidas para o parâmetro em questão.

2.10. Análises estatísticas

Os dados obtidos foram avaliados pelo teste de normalidade Shapiro-Wilk. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) seguido pelos testes post hoc de Tukey (testes *in vitro*) e Newman-Keuls (testes *in vivo*) e a dispersão principal foi expressa como o desvio padrão. Foi adotado o nível de significância igual a 5%. Todas as análises estatísticas foram realizadas pelo programa GraphPad Prism versão 6.01.

3. RESULTADOS

3.1. Atividade antioxidante da curcumina *in vitro*

O método de DPPH é muito utilizado para se determinar a atividade antioxidante em extratos e substâncias isoladas como: compostos fenólicos, fenilpropanoides, fenólicos totais, flavonóis, cumarinas, quitosana com diferentes pesos moleculares, antocianinas, antocianidinas, carotenoides, rutina e kaempferol (NEPLAME, 2017).

Na concentração mais baixa testada, 25 µg/mL de curcumina, a porcentagem de redução do DPPH foi igual ($p>0,05$) ao ácido ascórbico e menor ($p\leq 0,05$) que a rutina e BHT (Fig. 1A). Nas concentrações de 50, 75 100, 125 e 150 µg/mL de curcumina, a capacidade de evitar a oxidação do DPPH, foram menores ($p\leq 0,05$) em relação ao ácido ascórbico, rutina e BHT (Fig. 1B-F). Na concentração de 175 µg/mL de curcumina a capacidade de redução do DPPH foi menor ($p\leq 0,05$) ao ácido ascórbico e igual ($p>0,05$) a rutina e BHT (Fig. 1G). A curcumina em concentração de 200 µg/mL apresentou capacidade de oxidação do DPPH igual ($p>0,05$) ao ácido ascórbico e maior ($p\leq 0,05$) que a rutina e o BHT (Fig. 1H).

Em relação a capacidade antioxidante nas diferentes concentrações da curcumina, é possível verificar que a capacidade em reduzir o DPPH aumentou proporcionalmente ao aumento da concentração da curcumina, assim quanto maior a concentração de curcumina maior foi o potencial antioxidante ($R^2=0,9983$) (Fig.2).

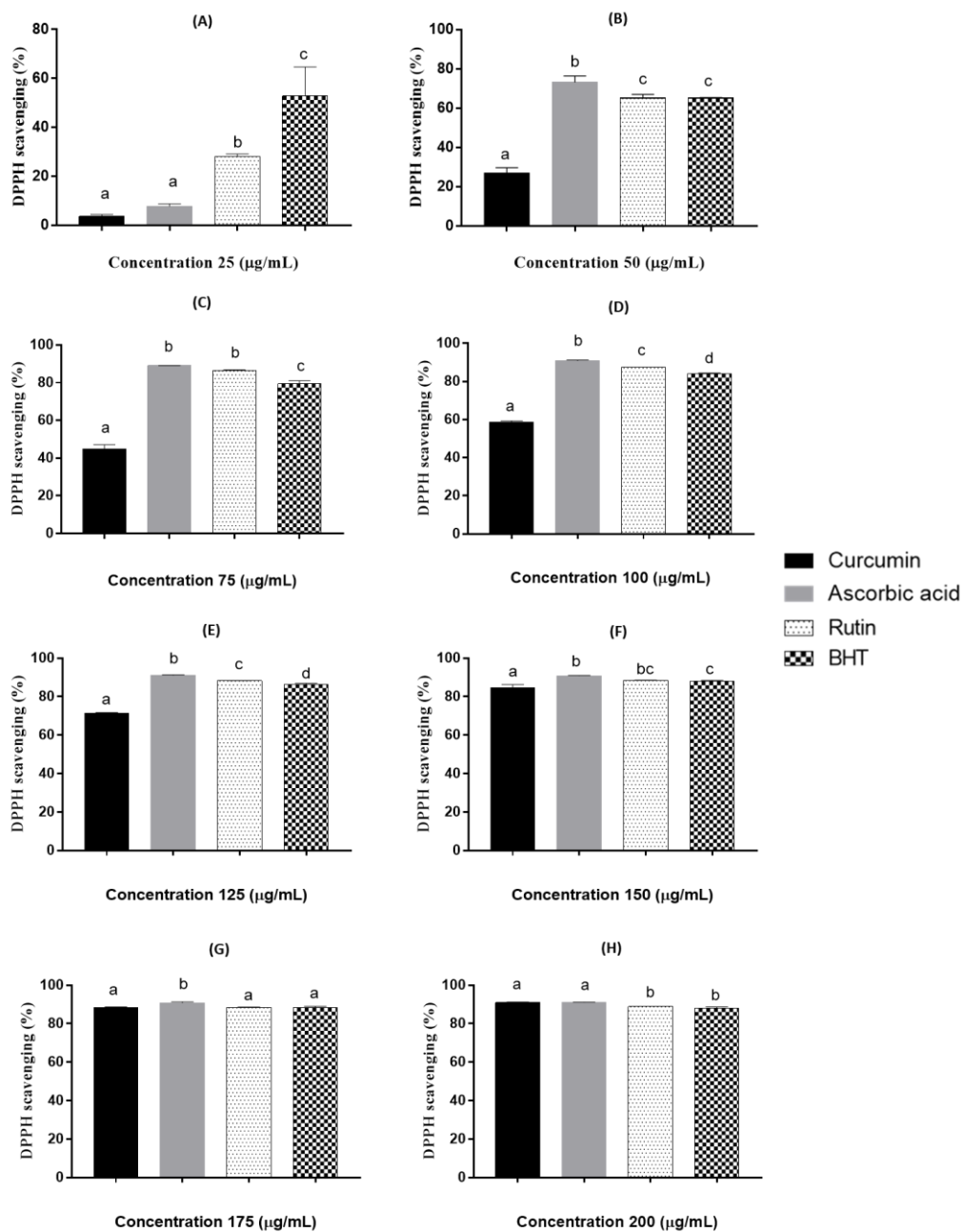


Figura 1. Atividade antioxidante da curcumina nas concentrações de 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175 e 200 µg/mL pelo teste de DPPH. ^{a, b, c} médias seguidas por letras distintas no mesmo gráfico diferem entre si pelo teste *post-hoc* de Tukey a 5% de probabilidade.

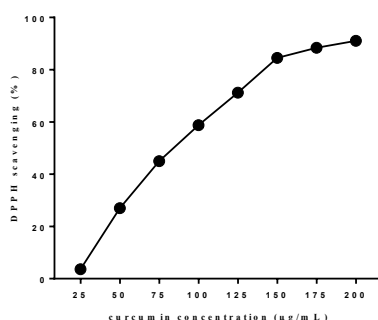


Figura 2. Capacidade da curcumina em inibir o DPPH nas concentrações de 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200 µg/mL. Dados expressos em média ± DP.

3.2. Viabilidade celular de macrófagos da linhagem RAW 264.7 após tratamento com curcumina

Ensaio *in vitro* foram realizados com macrófagos da linhagem RAW 264.7. Essas células secretam enzimas, proteínas plasmáticas, ERO, prostaglandinas e citocinas. Portanto, os macrófagos apresentam função importante na regulação imunológica e proteção contra o estresse oxidativo e a inflamação (POZNYAK et al., 2020).

O Aumento na taxa da viabilidade celular pode indicar indução de proliferação dos macrófagos pela curcumina, a redução pode indicar efeito citotóxico e a não alteração da taxa em relação ao controle, indica que o composto não afeta a viabilidade celular.

Nas primeiras 24 horas, a curcumina nas menores concentrações 6.26, 12.5 e 25 µg/mL não afetou a viabilidade celular, porém nas maiores concentrações 50, 100 e 200 µg/mL demonstrou efeito citotóxico. Também foi possível observar que o DMSO na concentração de 0,4% não demonstrou ser tóxico para as células, visto que, foi o veículo utilizado para diluição da curcumina (Fig. 3).

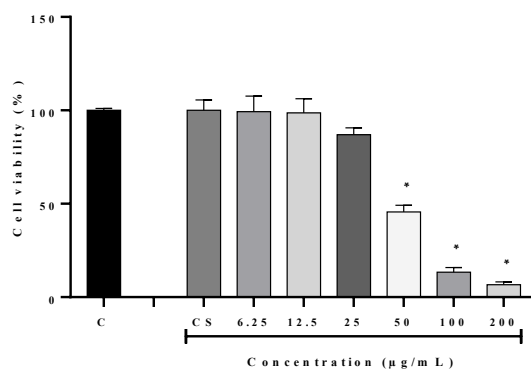


Figura 3. Avaliação da viabilidade celular de diferentes concentrações de curcumina. C: controle (DMEM); CS: controle do solvente (DMEM+0,4% DMSO). *Diferença estatística significativa em relação ao controle pelo teste *post-hoc* de Tukey a 5% de probabilidade.

3.3. Atividade antioxidante da curcumina em células de macrófago RAW 264.7

Previamente à indução do estresse oxidativo, uma curva de concentrações de H_2O_2 foi construída para auxiliar na definição da dose efetiva à diminuição de, no mínimo, 80% da viabilidade celular. Após 24 horas em contato com diferentes concentrações de curcumina observou-se que as concentrações de 0.5, 1, 2 e 4 reduziram a viabilidade celular, porém o valor referente a 80% de inibição da viabilidade celular foi de 2 mM (Fig. 4).

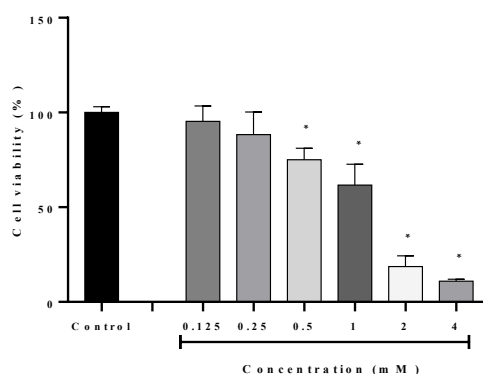


Figura 4. Viabilidade dos macrófagos de linhagem RAW 264.7 tratados com H_2O_2 durante 24 horas. Controle: DMEM+0,4% DMSO. *Diferença estatística significativa em relação ao controle < pelo teste *post-hoc* de Tukey a 5% de probabilidade.

Após a definição da menor concentração, 2 mM de H_2O_2 , que possibilitou uma redução de 80% da viabilidade celular, temos que nas concentrações de 6,25 e 12,5 µg/mL de curcumina as atividades são iguais ($p > 0.05$) ao controle. E a taxa de sobrevivência das células lesadas por

H₂O₂ nas concentrações de 25, 50, 100 e 200 µg/mL de curcumina diminuiu ($p \leq 0,05$) significativamente em relação ao controle (Fig. 5).

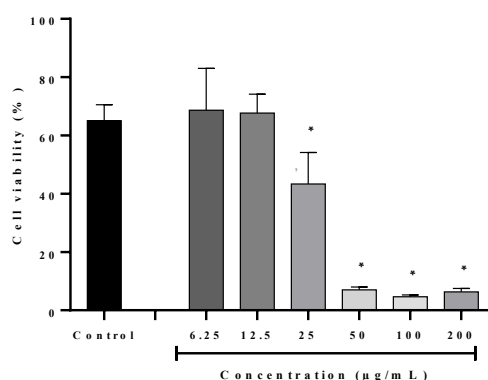


Figura 5. Citoproteção- Viabilidade macrófagos de linhagem RAW 264.7 tratados com curcumina e expostos ao H₂O₂. *Diferença estatística significativa em relação ao controle pelo teste *post-hoc* de Tukey a 5% de probabilidade.

3.4. Estudo in vivo - Efeito do gel transdérmico de curcumina (GTC) nas medidas biométricas

Ao final de 28 dias de experimento o ganho de peso foi igual ($p < 0,05$) nos grupos CN, C100, C200 e C400 (0.57 ± 0.38 ; 1.29 ± 0.63 ; 0.50 ± 0.04 ; 0.39 ± 0.66 nos grupos CN, C100, C200 e C400, respectivamente) (Fig. 6A). O tratamento com GTC não alterou o IMC dos grupos experimentais (Fig. 6B). Assim também, não houve diferença no peso do intestino delgado, cólon e ceco entre os grupos CN, C100, C200 e C400 (Fig. 6C).

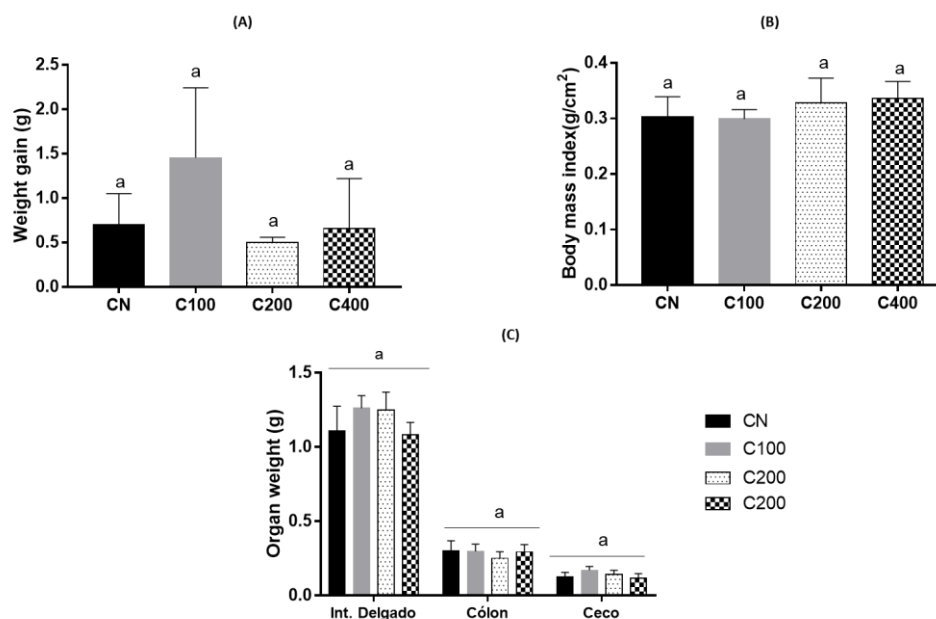


Figura 6. Medidas biométricas camundongos IL-10KO tratados com gel transdérmico de curcumina por 4 semanas. ^{a, b} médias seguidas por letras distintas no mesmo gráfico diferem entre si pelo teste *post-hoc* de Newman Keuls a 5% de probabilidade. CN: grupo controle IL-10 KO; C100: grupo teste com concentração do gel de 100 mg/Kg de curcumina; C200: grupo teste com concentração do gel de 100 mg/Kg de curcumina; C200: grupo teste com concentração do gel de 100 mg/Kg de curcumina.

3.5. Efeito do GTC na peroxidação lipídica e nas enzimas envolvidas no estresse oxidativo

Em relação ao MDA, um biomarcador da peroxidação lipídica, as concentrações no intestino delgado foram iguais ($p \geq 0,05$) para todos os grupos experimentais (Fig. 7A). Foram observadas ainda no estudo, a concentrações de MDA no tecido do cólon, sendo também iguais ($p \geq 0,05$) em todos os grupos, tratados e não tratados com GTC de curcumina (Fig. 7B).

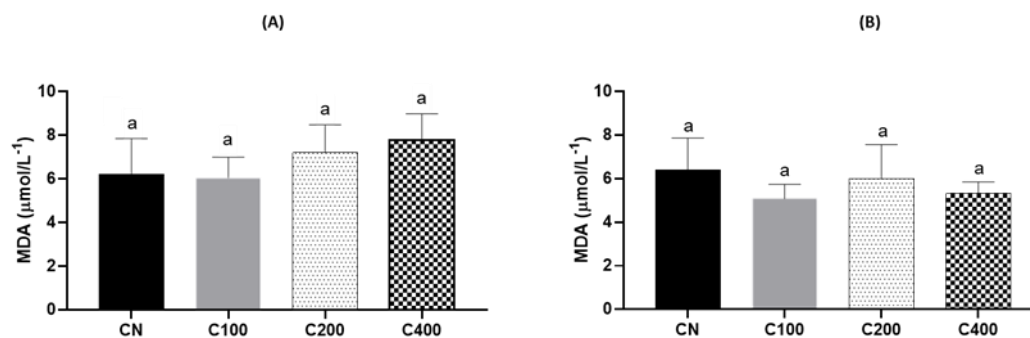


Figura 7. Efeito do gel transdérmico de curcumina (GTC) no biomarcador do estresse oxidativo. Atividade do MDA no intestino delgado (A) e cólon (B) em animais tratados com gel transdérmico de curcumina por 4 semanas. ^a Médias seguidas pela mesma letra no mesmo gráfico não diferem entre si pelo teste *post-hoc* de Newman Keuls a 5% de probabilidade. CN: grupo controle IL-10 KO; C100: grupo teste com concentração do gel de 100 mg/Kg de curcumina; C200: grupo teste com concentração do gel de 100 mg/Kg de curcumina; C400: grupo teste com concentração do gel de 100 mg/Kg de curcumina.

Em relação as atividades das enzimas antioxidantes, temos no presente estudo, que no intestino delgado, as concentrações da enzima SOD foram menores ($p < 0.05$) nos grupos tratamentos C100, C200 e C400 em relação ao grupo de animais do CN (Fig. 8A). A atividade da catalase (CAT) foi igual ($p \geq 0.05$) entre os grupos CN, C100, C200 e C400 (Fig. 8C). Ao se avaliar a concentração da enzima glutathione transferase, temos um aumento no grupo C200 ($p < 0.05$) em relação aos animais dos grupos CN, C100 e C400. entre si (Fig. 8E).

Ao se avaliar o cólon, observamos que as concentrações de SOD foram iguais ($p \geq 0.05$) em todos os grupos experimentais, tratados e não tratados com gel transdérmico de curcumina (Fig. 8B). Tivemos também a concentração de catalase iguais ($p \geq 0.05$) em todos os grupos experimentais, tratados e não tratados (Fig. 8D). E concentrações iguais ($p \geq 0.05$) de GST em todos os grupos (Fig. 8F).

Ao se avaliar a produção de óxido nítrico a nível de intestino delgado, tivemos a concentração do nitrito nos grupos CN, C100, C200 e C400, iguais ($p \geq 0.05$) entre si (Fig. 8G). Em nível do cólon, o nitrito foi maior ($p < 0.05$) no grupo dos animais C400 em relação a concentração nos grupos C100 e CN, e tivemos as concentrações nos animais dos grupos CN, C100 e C200 iguais ($p \geq 0.05$) e C200 e C400 também iguais ($p \geq 0.05$) entre sim. (Fig. 8H).

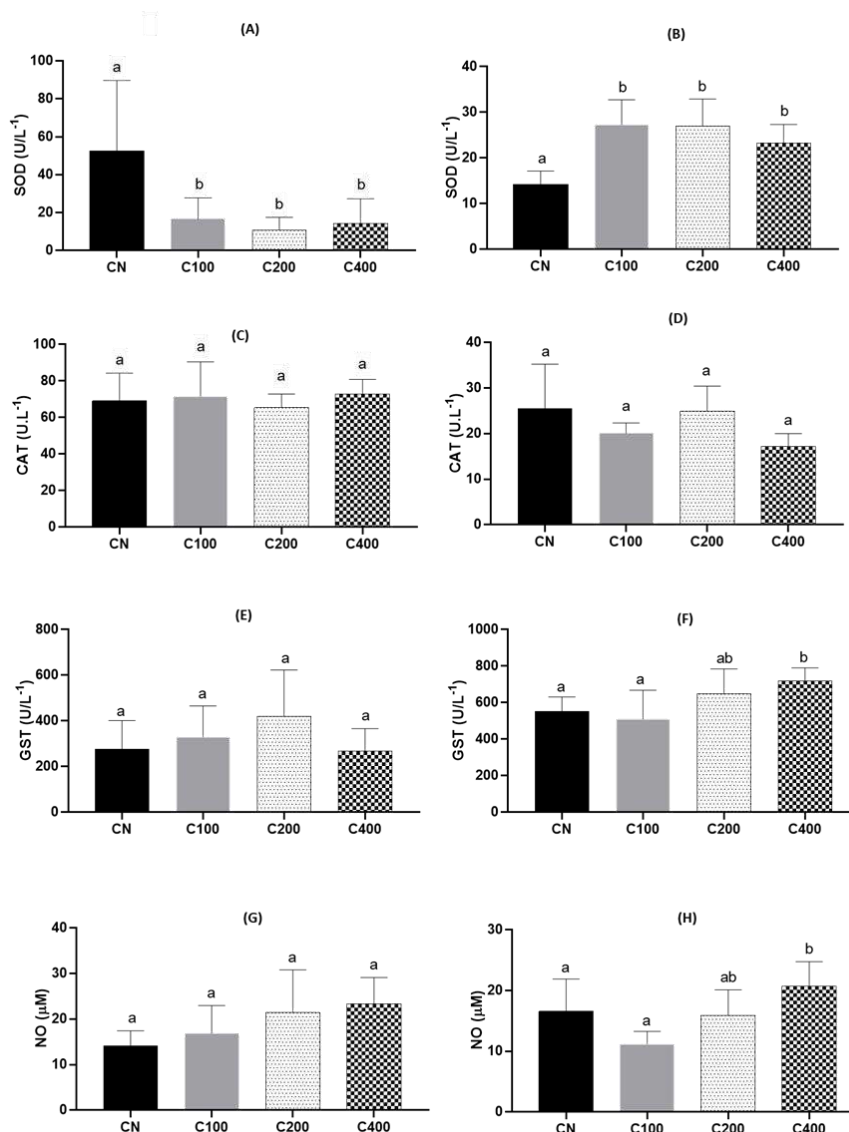


Figura 8. Atividade de enzimas antioxidantes no intestino delgado (A, C, E e G) e cólon (B, D, F e H) em animais tratados com gel transdérmico de curcumina por 4 semanas. ^{a, b} médias seguidas por letras distintas no mesmo gráfico diferem entre si pelo teste *post-hoc* de Newman Keuls a 5% de probabilidade CN: grupo controle IL-10 KO; C100: grupo teste com concentração do gel de 100 mg/Kg de curcumina; C200: grupo teste com concentração do gel de 200 mg/Kg de curcumina; C400: grupo teste com concentração do gel de 400 mg/Kg de curcumina. CAT: Catalase; SOD: Superóxido Dismutase; GST: Glutathione S-Transferase.

3.6. Efeito do gel transdérmico de curcumina no tecido do intestino delgado, cólon e ceco em camundongos IL-10KO com inflamação intestinal

Através das análises histológicas, foram observadas diferenças entre os grupos experimentais nas estruturas do intestino delgado, cólon e ceco após 28 dias tratamento.

Ao avaliar o efeito do GTC no intestino delgado, observa-se que altura da camada muscular foi maior ($p < 0.05$) nos grupos C100, C200 e C400 em relação ao grupo CN e os grupos C100, C200 e C400 são iguais ($p \geq 0.05$) entre si (Fig. 9A). Em relação altura do epitélio na vilosidade, observa-se que o grupo C200 apresentou o maior epitélio ($p < 0.05$) em relação aos grupos CN, C100 e C400 e os grupos CN, C100 e C400 foram iguais ($p \geq 0.05$) entre si (Fig. 9B).

As alturas do epitélio na cripta foram iguais ($p \geq 0.05$) entre nos grupos CN, C100, C200 e C400 (Fig 9C). No diâmetro da cripta verifica-se que os grupos CN, C100, C200 e C400 também são iguais ($p \geq 0.05$) em si (Fig. 9D).

E em relação ao diâmetro da vilosidade e altura da vilosidade os grupos experimentais tratados e não tratados com GTC também não diferiram ($p \geq 0.05$) entre si (Fig. 9E e F).

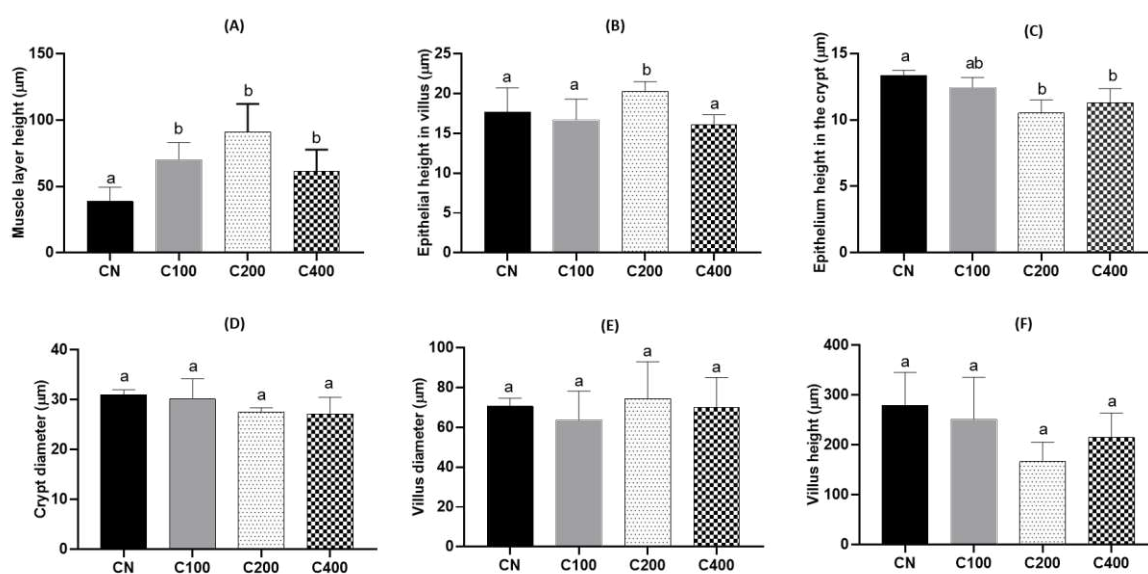


Figura 9. Efeito do gé l transdérmico de curcumina no intestino delgado de camundongos IL-10 KO portadores de inflamação intestinal. ^{a, b, c}. Médias seguidas por letras distintas no mesmo gráfico diferem entre si pelo teste post-hoc de Newman Keuls a 5% de probabilidade. CN: grupo controle IL-10 KO; C100: grupo teste com concentração do gel de 100 mg/Kg de curcumina; C200: grupo teste com concentração do gel de 200 mg/Kg de curcumina; C400: grupo teste com concentração do gel de 400 mg/Kg de curcumina.

Ao avaliar o efeito do GTC no cólon, observa-se que a altura da camada muscular nos grupos CN, C100, C200 e C400 foram iguais ($p \geq 0.05$) entre si (Fig 10A). Assim também as alturas do epitélio na cripta, o diâmetro na vilosidade e as medidas do diâmetro na lâmina própria não diferiram ($p \geq 0.05$) entre os animais tratados e não tratados com curcumina (Fig. 10C).

Em relação a profundidade da cripta, no cólon, essas foram maiores ($p < 0.05$) nos grupos C200 e C400 em relação ao grupo CN, iguais ($p \geq 0.05$) entre os grupos experimentais C100, C200 e C400 e também iguais ($p \geq 0.05$) entre os grupos CN e C100 (Fig. 10E).

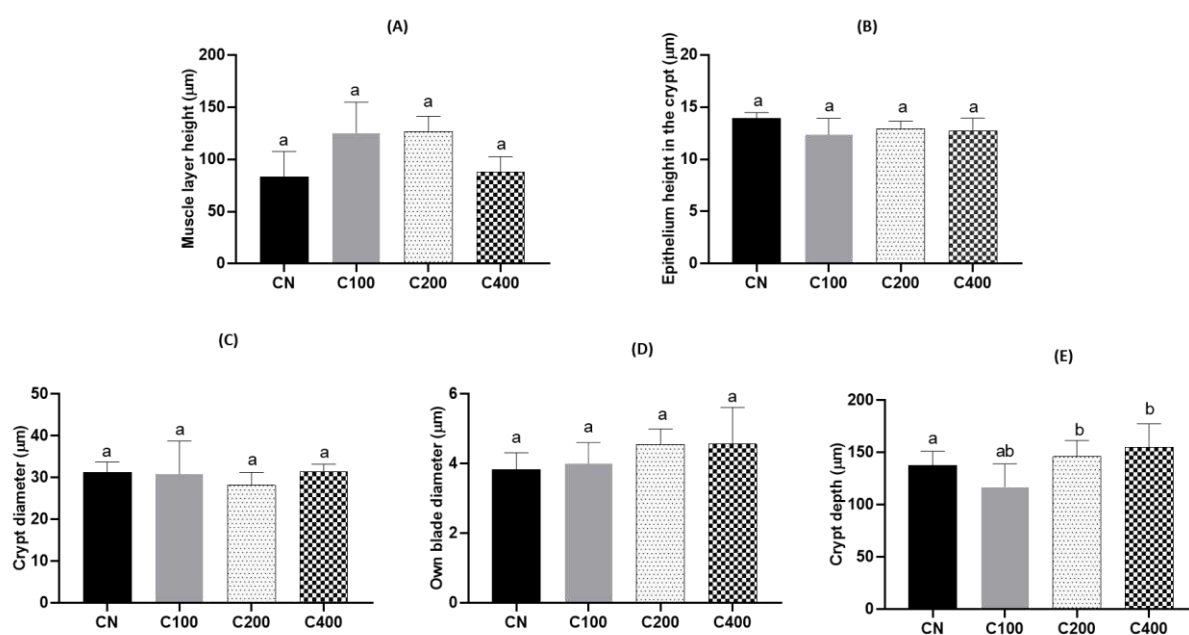


Figura 10: Efeito dos géis transdérmicos de curcumina no cólon de camundongos IL-10 KO portadores de inflamação intestinal. ^{a, b} médias seguidas por letras distintas no mesmo gráfico diferem entre si pelo teste post-hoc de Newman Keuls a 5% de probabilidade. CN: grupo controle IL-10 KO; WT: grupo controle selvagem; C100: grupo teste com concentração do gel de 100 mg/Kg de curcumina; C200: grupo teste com concentração do gel de 200 mg/Kg de curcumina; C400: grupo teste com concentração do gel de 400 mg/Kg de curcumina.

Após realizadas as análises histomorfométricas no ceco, com objetivo de avaliar o efeito do GTC, observa-se que as alturas da camada muscular foram iguais ($p \geq 0.05$) entre todos os grupos CN, C100, C200 e 400 (Fig. 11A). Ao se avaliar as medidas da altura do epitélio na cripta; diâmetro da cripta e profundidade da cripta também não foram observadas as diferenças ($p \geq 0.05$) entre os animais dos grupos experimentais (Fig. 11B-D). Em relação ao diâmetro da

lâmina própria, temos que o grupo C400 apresentou maior diâmetro em relação ao grupo CN, os grupos C100, C200 e C400 foram iguais ($p \geq 0.05$) entre si e os grupos CN, C100 e C200 também foram iguais ($p \geq 0.05$) entre si (Fig. 11E).

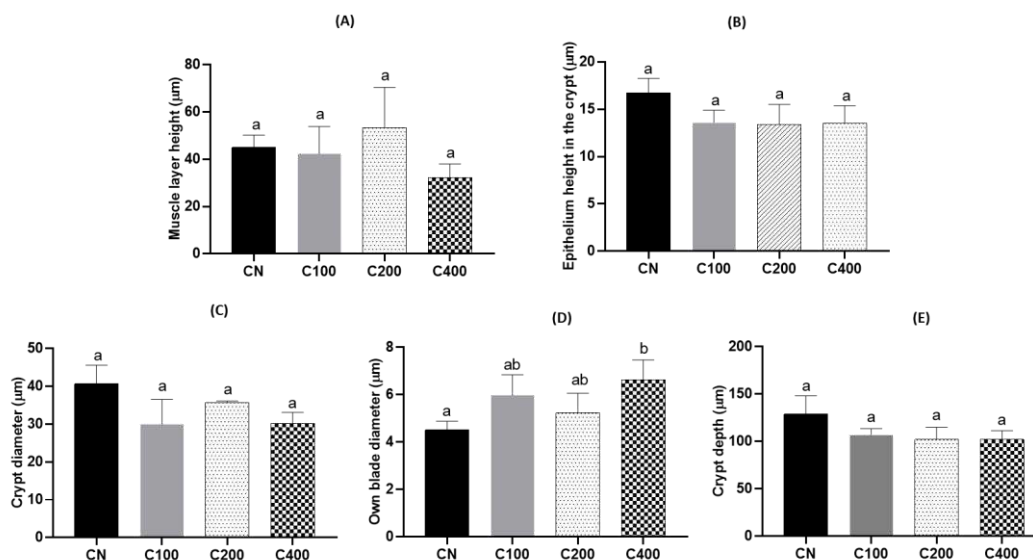


Figura 11. Efeito dos gel transdérmico de curcumina no ceco de camundongos IL-10 KO portadores de inflamação intestinal. ^{a, b} médias seguidas por letras distintas no mesmo gráfico diferem entre si pelo teste post-hoc de Newman Keuls a 5% de probabilidade. CN: grupo controle IL-10 KO; WT: grupo controle selvagem; C100: grupo teste com concentração do gel de 100 mg/Kg de curcumina; C200: grupo teste com concentração do gel de 200 mg/Kg de curcumina; C400: grupo teste com concentração do gel de 400 mg/Kg de curcumina.

4. DISCUSSÃO

A curcumina é o principal composto presente na *Curcuma longa* (açafrão) e tem sido usado na medicina tradicional para o tratamento de várias doenças. Numerosas investigações indicaram o efeito benéfico da curcumina em suprimir a ativação de NF- κ B, regulando assim a expressão de genes pró-inflamatórios, inibindo a transcrição de, por exemplo, COX-2 e iNOS que desempenham um papel importante na sinalização envolvidas no estresse oxidativo e processo inflamatório (POURBAGHER-SHAHRI et al., 2021; LU et al., 2018; YUAN et al., 2018).

Pela importância dos macrófagos no sistema imunológico e sua vulnerabilidade a ROS, usando macrófagos como modelos de triagem de drogas pode fornecer uma plataforma científica intuitiva para pesquisar os efeitos antioxidantes de produtos naturais no sistema imunológico (LIN et al., 2019). Assim no presente estudo a capacidade antioxidante *in vitro* da curcumina, foi examinado através da atividade de eliminação de radicais de DPPH em

macrófagos e foi confirmada pela sua porcentagem restante no sistema. A curcumina demonstrou potencial antioxidante e de eliminar radicais em todas as concentrações, sendo que nas concentrações mais altas, ela se assemelha ao potencial inibitório de três antioxidantes muito utilizados (ácido ascórbico, rutina e BHT) e foi observado que a concentração de curcumina é diretamente proporcional a ação antioxidante. O presente estudo corrobora com os resultados de LEE e colaboradores (2021), que estudou extrato seco de cúrcuma contendo 40% de curcumina e observaram aumento na atividade de eliminação de radicais de DPPH de uma maneira dependente da dose, ou seja, ao aumentar a concentração de curcumina temos o aumento da capacidade dessa em eliminar os radicais oxidativos. Pontes-Quero e colaboradores (2021) observaram a viabilidade de RAW 264.7 quando em contato com nanopartículas de curcumina de diferentes concentrações constataram também que essas moléculas evitavam a oxidação dos radicais de DPPH ao estabelecer a vitamina E como controle máximo da atividade de eliminação de radicais possível no ensaio.

Em relação a viabilidade celular da curcumina, pelo reagente MTT, foi possível afirmar que nas maiores concentrações de curcumina, houve uma redução na viabilidade celular e consequentemente um indicador de toxicidade, possivelmente pelo comprometimento das organelas, em especial as mitocôndrias. Os nossos achados estão de acordo com o estudo de Ben e colaboradores (2011), que fazendo o ensaio com MTT, avaliaram os macrófagos tratados como 20 e 40 μM de curcumina no período de 24 horas, comprovando também a diminuição da viabilidade. Lin e colaboradores (2019), também observaram uma redução significativa na viabilidade celular de macrófagos quando tratados com uma concentração de curcumina superior a 40 μM .

Em relação a viabilidade celular da curcumina por indução do estresse oxidativo com peróxido de hidrogênio, sabe-se que é um modelo bastante utilizado para avaliar o efeito citoprotetor dos compostos com potencial antioxidante (REN et al., 2018; PONNUSAMY et al., 2015). Embora o H_2O_2 seja um importante mensageiro secundário, seus níveis precisam ser controlados para evitar danos a processos celulares, a produção excessiva de peróxido, ocorrem através de sistemas enzimáticos e moléculas de radicais livres (FINKEL, 1998, GABBITA et al., 2000). Assim, o protocolo experimental de estresse celular induzido por H_2O_2 *in vitro* em macrófago simularia uma condição de agressão decorrente de altos níveis de ROS produzidos em processos inflamatórios na DII.

Observou-se que a concentração de 2mM de curcumina foi a menor concentração que promovia a diminuição de, no mínimo, 80% da viabilidade celular. Posteriormente, tivemos

que, as células que foram submetidas a exposição do H₂O₂, após o tratamento com as maiores concentrações de curcumina, não foram capazes de gerarem mudanças no *status* de oxirredução, pelo contrário, apresentaram efeito citotóxico. Resultado esse, que está em acordo com os estudos de Dong e colaboradores (2020) observaram ao estudar câncer de cólon, que a curcumina e o ácido ursólico não apresentaram quaisquer efeitos protetores contra o H₂O₂ e até mesmo levaram a um declínio acentuado na porcentagem celular das células Caco-2, o que resultou na inibição viabilidade celular dependente do aumento da concentração de curcumina.

Compostos fitoquímicos podem induzir um estresse ameno que provoca uma resposta adaptativa positiva, preparando as células para uma rápida reação na produção de compostos antioxidantes quando submetidas a estresses futuros. Esse fato recebe o nome de hormese (DA SILVA et al., 2017, LIMA et al., 2011). A hormese pode explicar os efeitos observados em no presente estudo, onde a curcumina em baixas concentrações não afeta a viabilidade da célula e em altas concentrações é tóxica aumentando as moléculas de ROS em células dos macrófagos. Lin e colaboradores (2019) em seus estudos constataram que curcumina em baixa e média dose (5 e 10 µM) aumentou a capacidade das células de eliminar ROS, porém o nível de ROS aumentou significativamente no grupo de alta dose de curcumina (40, 60, 80 e 100 µM).

Ao avaliar o experimento *in vivo*, os efeitos da curcumina na forma de gel transdérmico (GTC) foram avaliados, em relação à capacidade protetora sobre o estresse oxidativo e capacidade de desempenhar um papel significativo no tratamento de doenças inflamatórias intestinais (DII), especialmente como terapia adjuvante ao utilizar o GTC (Araujo et al, 2021, no prelo). Desta forma, investigou-se o potencial benefício do gel transdérmico de curcumina (GTC) em diferentes concentrações, em relação à sua capacidade de redução do estresse oxidativo e na estabilização do processo da doença inflamatória intestinal nos tecidos do intestino delgado e cólon em animais induzidos a DII.

No presente estudo, não foi possível observar maior ganho de peso entre o grupo dos animais doentes tratados com o gel transdérmico em diferentes concentrações de curcumina, como também não houve ganho de peso nos animais doentes não tratados. Portanto o GTC não foi capaz de evitar a perda de peso dos animais, porém também não contribuiu para a piora da DII, assim, não foi possível observar uma melhora das características morfológica da doença. Em nosso estudo anterior, Araujo e colaboradores (2021, no prelo) observou que o GTC com concentração de 100mg de curcumina/g de prentavan® atenuou a perda de peso, indicando uma melhora nos parâmetros morfológicos dos animais afetados com DII.

O estresse oxidativo, definido como um desequilíbrio redox, entre moléculas pró-oxidantes e antioxidantes, realiza papel essencial na lesão celular, está fortemente associado às respostas inflamatórias e tem sido implicado na propagação e aumento da DII (KRZYSZEK-KORPACKA et al., 2020). Um mecanismo proposto como subjacente à fisiopatologia da DII é o desequilíbrio redox. As moléculas oxidantes ou espécies reativas de oxigênio (ERO) estão envolvidas na patogênese e progressão de distintas doenças que tem como característica em comum a inflamação crônica (ROSSO et al., 2021; SOARES et al., 2015; ZHU & LI, 2012). Porém, sabe-se que os mecanismos de defesa e eliminação de radicais oxidantes, podem ser insuficientes para lidar com a superprodução de ROS (SCHANAIDER et al., 2005).

No presente estudo, ao avaliar as enzimas das ERO, temos que o gel transdérmico de curcumina, foi capaz de reduzir, no intestino delgado, as atividades da SOD. A redução da concentração das enzimas antioxidante, pode estar justificada pela propriedade da curcumina em eliminar ERO por ação direta na desintoxicação de radicais oxidantes. Assim, temos os efeitos sinérgicos da curcumina que junto as enzimas endógenas são responsáveis pela defesa antioxidante e promovem o reequilíbrio redox celular de animais com doença inflamatória intestinal (KRZYSZEK-KORPACKA et al., 2020; LOPEZ et al., 2016). Nesta condição, a necessidade de enzimas antioxidantes endógenas, como SOD, catalase, glutatona, entre outros, é menor. Esse fato, pode ter levado à menor produção da SOD no presente estudo, a fim de equilibrar o estado redox do organismo (KHOSRAVI et al., 2018).

Em relação ao cólon, o tratamento com GTC foi eficiente em aumentar a concentração da SOD em todos os grupos tratados. A SOD como primeira linha de defesa enzimática contra a produção de EROs, atua catalisando a dismutação do ânion radical superóxido, produzindo H_2O_2 , que deve ser retirado do meio (POPRAC et al., 2017). Tivemos também que o gel transdérmico aumentou a concentração de GST e ON no grupo tratado com 400 mg por quilo de peso de curcumina. SHEETHAL e colaboradores (2020), observaram em seu estudo com a suplementação de curcumina + galactomananas derivadas do feno-gregos, melhora nos níveis das enzimas antioxidantes no cólon, principalmente SOD, GPx e CAT, em ratos wistar com CU induzida. Estudos mostraram que curcumina vem sendo usada para a prevenção do estresse oxidativo, pois promove a melhora dos níveis das enzimas antioxidantes como SOD, GST e CAT, além da inibição da produção de EROs, podendo desta forma ser utilizada em situações de pré e pós-tratamento da doença inflamatória intestinal, na possibilidade de controlar o equilíbrio redox (FARZAEI et al., 2018; ARAÚJO, 2019; DAI et al., 2015)

A curcumina é utilizada no restabelecimento da saúde intestinal em vários modelos animais de colite ulcerativa induzida (SADEGHI et al., 2019; MASOODI et al., 2018; KEDIA et al., 2017). Os estudos citados anteriormente corroboram com os dados achados no presente trabalho. Assim, nossos estudos evidenciam a contribuição da curcumina, presente no GTC, em atenuar o estresse oxidativo causado pela inflamação intestinal e mostrou a não dependência da dose em relação aos resultados de forma geral da redução do estresse oxidativo.

A avaliação histomorfométrica dos órgãos estudados são procedimentos de grande importância para que possamos identificar no tecido a presença de atrofia, hipertrofia e outras alterações celulares para constatação dos danos patologia presentes (ANDRADE et al., 2013; SAMPEY et al., 2011). A metodologia do diagnóstico histológico das DII se dá em três etapas: a primeira consiste em definir se existe doença inflamatória; a segunda em observar indícios de lesão inflamatória crônica da mucosa e a terceira etapa consiste no diagnóstico histológico específico da DII, em doença de Cohn ou retocolite ulcerativa (ZALTMAN et al., 2018).

Sabe-se que a DII consiste nas alterações morfológicas da mucosa que traduzem em lesões inflamatórias, envolvem aumento do infiltrado inflamatório e modificação da sua composição, associado a lesão do epitélio. Essa lesão pode ser identificada pela visualização direta da perda da integridade do revestimento epitelial como úlcera, erosão, ruptura de criptas ou por inferência, pela reação tecidual, como depleção de mucina, distorção da arquitetura, metaplasia, atrofia muscular (ZALTMAN et al., 2018; MALOY & POWRIE, 2011).

No presente estudo, o tratamento com gé l transdérmico de curcumina apresentou uma considerável melhora na morfologia estrutural ao avaliar as camadas musculares do intestino delgado, pois foi evidenciado o efeito benéfico do GTC ao observar o aumento da camada muscular nos animais tratados com 100, 200 e 400 mg de curcumina. No cólon e ceco, o GTC não aumentou a camada muscular, porém também não causou piora no tecido muscular. Observou-se também, no intestino delgado, uma maior integridade do epitélio na vilosidade entre os animais tratados com 200 mg de curcumina, o que permitiu a sua possível reestruturação no presente estudo. O GTC induziu um aumento na espessura do epitélio das vilosidades em um dos tratamentos experimentais, o que pode sugerir essa hipertrofia como resposta positiva ao estímulo do tratamento com curcumina.

O tratamento com GTC foi eficaz em aumentar, no ceco, a profundidade da cripta no grupo tratado com gel de concentração de 400 mg de curcumina. Assim, pode-se inferir que com uma maior profundidade da cripta temos uma maior atividade de proliferação celular. Garantindo adequada taxa de renovação do epitélio, compensando as perdas nas extremidades

das vilosidades (PLUSKE et al., 1997). Um aumento na profundidade da cripta na mucosa intestinal pode indicar a reposição das perdas celulares na região apical das vilosidades (PEREZ-LOPEZ et al., 2016).

Estudos demonstram que a curcumina desempenha um papel protetor histológico em modelos de IBD quimicamente induzidos em camundongos (KEDIA et al., 2017; SAREEN, JAIN & DHAR, 2016). Contudo, o GTC apresentou valores estatisticamente iguais em relação aos parâmetros avaliados no tecido para defesa antioxidante e inflamação, entre os animais doentes e não doentes. A possível explicação é pelo fato das áreas de inflamação acometida pela DII, representadas clinicamente entre as doenças de Crohn (DC) e colite ulcerativa (CU). Estas doenças (DC e CU), não abordam todas as regiões e extensões do intestino. A doença de Crohn pode afetar qualquer região do intestino em um padrão descontínuo, geralmente envolve o íleo terminal, ceco, área perianal e cólon. E a colite ulcerosa envolve o reto e pode afetar parte ou todo o cólon em um padrão contínuo (GUAN, 2019).

5. CONCLUSÃO

Em conclusão, este estudo, demonstra os potenciais efeitos protetores da curcumina *in vitro* e *in vivo* na forma do gel transdérmico de curcumina sobre o estresse oxidativo e na melhora da morfologia intestinal podendo levar a novas estratégias para o manejo da DII, oferecendo uma expectativa de aplicação na terapia adjuvante da DII que possa ser eficaz devido às propriedades antioxidantes e anti-inflamatória, observadas na redução do estresse oxidativo, e a restauração do intestino diante da renovação celular em animais.

6. REFERENCIAS

AGGARWAL, B. B.; SUNG, B. Pharmacological basis for the role of curcumin in chronic diseases: an age-old spice with modern targets. **Trends pharmacol. sci.**, [S.L.], v. 30, n. 2, p. 85-94, fev. 2009.

AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods enzymol.**. v.105, p.121-106. 1984.

ANDRADE, G. et al. The addition of whole soy flour to cafeteria diet reduces metabolic risk markers in wistar rats. **Lipids health dis.**, v. 12, n. 1, p. 145, out. 2013.

ARNOTT, I.; ROGLER, G.; HALFVARSON, J. O. Manejo da Doença Inflamatória Intestinal em Idosos: Current Evidence and Future Perspectives. Inflamação. **Intest. Dis**, v.2, p.189–199, 2018.

ARAÚJO, O. R. P. de. Avaliação da capacidade antioxidante e anti-inflamatória da Curcuma Longa, em diferentes tecidos de camundongos saudáveis e/ou com colite ulcerativa moderada induzida por sulfato de sódio dextrana. 2019. 142 f. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia, Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2019.

ARAÚJO, F. O.; BRUM, M. F.; LIMA, C. F.; PICCOLO, M. S.; PIZZILO, V. R.; DIAZ-MUÑOZ, G.; BASTOS, D. S. S.; OLIVEIRA, L. L.; PELÚZIO, M. C. G.; DIAZ, M. A. N. Antioxidant and anti-inflammatory activity of curcumin transdermic gel on intestinal inflammation in animal models knockout IL-10. **An. Acad. Bras. Ciênc.**, 2021. No prelo.

AXELRAD, J. E., CADWELL, K. H., COLOMBEL, J.-F., & SHAH, S. C. The role of gastrointestinal pathogens in inflammatory bowel disease: a systematic review. **Therapeutic Advances in Gastroenterology**, 14, 2021.

BALESTRIERI, P.; RIBOLSI, M.; GUARINO, M. P. L.; EMERENZIANI, S.; ALTOMARE, A.; CICALA, M. Nutritional Aspects in Inflammatory Bowel Diseases. **Nutrients**, v.12, n.2, p. 372, 2020.

BEN, P. et al. Curcumin promotes degradation of inducible nitric oxide synthase and suppresses its enzyme activity in RAW 264.7 cells. **Int. immunopharmacol.** v.11, n.2, p.179–186. 2011.

BOURGONJE, A. R.; FEELISCH, M.; FABER, K. N.; PASCH, A.; DIJKSTRA, G.; GOOR, H. V. Oxidative Stress and Redox-Modulating Therapeutics in Inflammatory Bowel Disease. **Trends mol. med.**v.26, n.11, p.1034-1046, 2020.

CARUSO, R.; LO, B.C.; NÚÑEZ, G. Host–microbiota interactions in inflammatory bowel disease. **Nat. rev. immunol.**v. 20, p. 411–426, 2020.

CAVALCANTE, G. M., BARBOSA, P. & SILVA, A. A. Atividade antitumoral in vitro de *Prosopis juliflora* frente a células cancerígenas do tipo melanoma. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 4, p. e39510414095-e39510414095. 2021.

CHIN, K. The spice for joint inflammation: anti-inflammatory role of curcumin in treating osteoarthritis. **Drug Des Devel Ther**, v.10, p.3029-3042, 2016.

COELHO, M. R.; ROMI, M. D.; FERREIRA, D. M. T. P.; ZALTMAN, C.; SOARES-MOTA, M. The Use of Curcumin as a Complementary Therapy in Ulcerative Colitis: A Systematic Review of Randomized Controlled Clinical Trials. **Nutrients**, v.12, p.2296, 2020.

DA SILVA PITZ, Heloisa et al. Cytoprotective Effects of Jaboticaba (*Plinia peruviana*, Poir. Govaerts) Fruit Peel Extracts against H₂O₂-Induced Oxidative Stress. **Reactive Oxygen Species**, v. 4, n. 11, p. 362-371, 2017.

DAI, C. et al. Curcumin attenuates quinocetone-induced oxidative stress and genotoxicity in human hepatocyte L02 cells. **Toxicol. mech. methods**. [S.L.], v. 25, n. 4, p. 340-346. 2015.

DONG, J.; LIANG, W.; WANG, T.; SUI, J.; WANG, J.; DENG, Z.; CHEN, D. Saponins regulate intestinal inflammation in colon cancer and IBD. **Pharmacol. res.**, v. 144, p. 66-72. 2019.

FALLAHI, F.; BORRAN, S.; ASHRAFIZADEH, M. ZARRABI, A.; POURHANIFEH, M. H.; MAHABADY, M. K. SAHEBKAR, A.; MIRZAEI, H. Curcumin and inflammatory bowel diseases: From in vitro studies to clinical trials, **Mol. immunol.**, v.130, p.20-30, 2021.

FARZAEI, M. H.; BAHRAMSOLTANI, R.; ABDOLGHAFARI, A. H.; SODAGARI, H. R.; ESFAHANI, S. A.; REZAEI, N. A mechanistic review on plant-derived natural compounds as dietary supplements for prevention of inflammatory bowel disease. **Expert rev. gastroenterol. hepatol.**, v. 10, n. 6, p. 745-758, 20 fev. 2016.

FARZANE H, F.; SARINA, B.; MILAD, A.; ALI, Z.; MOHAMMAD, H, P.; MAHMOOD, K, M.; AMIRHOSSEIN, S.; HAMED, M. Curcumin and inflammatory bowel diseases: From in vitro studies to clinical trials. **Mol. immunol.**, v.130, p. 20-30, 2021.

FINKEL, T. Oxygen radicals and signaling *Current Opinion in Cell Biology*, 1998.

GABBITA, S. P. et al. Redox regulatory mechanisms of cellular signal transduction. **Arch. biochem. biophys.**, 2000.

GRAHAM, D. B.; XAVIER, R. J. Pathway paradigms revealed from the genetics of inflammatory bowel disease. **Nature**, v. 578, n.7796, p.527–539, 2020.

GUAN, Q. A Comprehensive Review and Update on the Pathogenesis of Inflammatory Bowel Disease. **J. immunology res.**, p.1–16, 2019.

HABIG, W. H., PABST, M. J. & JAKOBY, W. B. Glutathione S-transferases: the first enzymatic step in mercapturic acid formation. **J. biol. chem.**, v. 249, n. 22, p. 7130-7139, 1974.

KAPLAN, G G, WINDSOR, J W. The four epidemiological stages in the global evolution of inflammatory bowel disease. **Nat. rev. gastroenterol. hepatol.**v. 18, p. 56–66 18, 2021.

KEDIA, S.; BHATIA, V.; THAREJA, S.; GARG, S.; MOULI, V.P.; BOPANNA, S.; TIWARI, V.; MAKHARIA, G.; AHUJA, V. Low dose oral curcumin is not effective in induction of remission in mild to moderate ulcerative colitis: Results from a randomized double blind placebo controlled trial. **World J. Gastrointest. Pharmacol. Ther.**, v. 8, p.147–154, 2017.

KHARE, T.; PALAKURTHI, S. S.; SHAH, B. M.; PALAKURTHI, S.; KHARE, S. Natural Product-Based Nanomedicine in Treatment of Inflammatory Bowel Disease. **Int. J. Mol. Sci.** v. 20, p. 3956, 2020.

KHOSRAVI, M.; POURSALEH, A.; GHASEMPOUR, G.; FARHAD, S.; NAJAFI, M. The effects of oxidative stress on the development of atherosclerosis. **Biol. chem.**, v.400, n.6, p.711-732 2018.

KILBY, K.; MATHIAS, H.; BOISVENUE, L.; HEISLER, C.; JONES, J. L. Micronutrient Absorption and Related Outcomes in People with Inflammatory Bowel Disease: A Review. **Nutrients**, v.11, 1388, 2019.

KRZYSZEK-KORPACKA, M.; KEMPIŃSKI, R.; BROMKE, M. A; NEUBAUER, K. Oxidative Stress Markers in Inflammatory Bowel Diseases: Systematic Review. **Diagnostics**, v.10, n. 601, 2020.

LEE, S.H.; KWON, J.E.; CHO, M.-L. Immunological pathogenesis of inflammatory bowel disease. **Intest. Res.** v.16, p.26–42, 2018.

LIMA, A. M.; NASCIMENTO, C. E. C.; SANTOS, C. H. M.; DOURADO, D. M.; SIQUEIRA, G. E, C.; RIGO, G. M. Eficácia da curcuma longa no tratamento da colite de desuso em ratos. **ABCD, arq. bras. cir. Dig.**, v.32, n. 3, p.1456, 2019.

LIN, X., BAI, D., WEI, Z., ZHANG, Y., HUANG, Y., DENG, H., & HUANG, X. Curcumin attenuates oxidative stress in RAW264.7 cells by increasing the activity of antioxidant enzymes and activating the Nrf2-Keap1 pathway. **Plos One**, v.14, n.5, p. e0216711, 2019.

LOFTUS JR. E. V. Clinical epidemiology of inflammatory bowel disease: incidence, prevalence, and environmental influences. **Gastroenterology**, v.126, pp. 1504-1517, 2004.

LU J., LIU X., LIAO Y., WANG D., CHEN J., & LI S. Formula Regulates Inflammatory Cytokines Production in 5/6 Nephrectomized Rats via Suppression of NF- κ B Activation. **Evidence-based complementary and alternative medicine: eCAM**, 7203547. 2018.

MALOY, K. J.; POWRIE, F. Intestinal homeostasis and its breakdown in inflammatory bowel disease. **Nature**, v.474, n.7351, p.298-306, 2011.

MARTINO, G., CAPUTO, A., SCHWARZ, P., BELLONE, F., FRIES, W., QUATTROPANI, M. C., & VICARIO, C. M. Alexithymia and Inflammatory Bowel Disease: A Systematic Review. **Frontiers in Psychology**, p.11, 2020.

MASOODI, M.; MAHDIABADI, M.A.; MOKHTARE, M.; AGAH, S.; KASHANI, A.H.; REZADOOST, A.M.; SABZIKARIAN, M.; TALEBI, A.; SAHEBKAR, A. The efficacy of curcuminoids in improvement of ulcerative colitis symptoms and patients' self-reported well-being: A randomized double-blind controlled trial. **J. Cell. Biochem.** v.119, p.9552–9559, 2018.

PEREZ-LOPEZ, A., BEHNSEN, J., NUCCIO, SP. *et al.* Mucosal immunity to pathogenic intestinal bacteria. **Nat Rev Immunol.** v.15, p.135-148. 2016.

PFEIFFER, E. *et al.* Curcuminoids Form Reactive Glucuronides In Vitro. **J. agric. Food chem.**, v. 55, n. 2, p. 538- 544, jan. 2007.

PLUSKE, J. R., HAMPSON, D.J & WILLIAMS, I. H. Factors influencing the structure and function of the small intestine in the weaned pig: a review. **Livest. prod. sci.**.v.51, n 1–3, p.215-236. 1997.

PONTES-QUERO, G. M. *et al.* Amphiphilic polymeric nanoparticles encapsulating curcumin: Antioxidant, anti-inflammatory and biocompatibility studies. **Materials Science and Engineering**. v. 121, p. 111793. 2021.

POPRAC, P. *et al.* Targeting Free Radicals in Oxidative Stress-Related Human Diseases. **Trends pharmacol. sci.**, v. 38, n. 7, p. 592-607, jul. 2017.

POURBAGHER-SHAHRI, A. M.; FARKHONDEH, T.; ASHRAFIZADEH, M. TALEBI, M.; SAMARGAHNDIAN, S. Curcumin and cardiovascular diseases: Focus on cellular targets and cascades. **Biomed. pharmacother.**, v.136, p. 111-214, 2021.

REN, H.; MENG, Q.; YEPURI, N.; DU, X.; SARPONG, J. O. & COONEY, R. N. Protective effects of glutathione on oxidative injury induced by hydrogen peroxide in intestinal epithelial cells. **J. Surg. Res.** v. 222, p. 39– 47. 2018.

ROSSO C, AARON A. A, ARMANDI A, CAVIGLIA G P, VERNERO M, SARACCO G M, ASTEGIANO M, BUGIANESI E & RIBALDONE D G. Inflammatory Bowel Disease Nurse— Practical Messages. **Nursing Reports.** v.11 n.2, p.229-241, 2021.

RUBIN, D. T.; ABREU, M. T.; RAI, V.; SIEGEL, C, A. Management of Patients with Crohns Disease and Ulcerative Colitis During the COVID-19 Pandemic: Results of an International Meeting. **Gastroenterology**,2020.

SADEGHI, N.; MANSOORI, A.; SHAYESTEH, A.; HASHEMI, S.J. The effect of curcumin supplementation on clinical outcomes and inflammatory markers in patients with ulcerative colitis. **Phytother. Res.**, v.34, p.1123–1133, 2019.

SAMARGHANDIAN, S.; AZIMI-NEZHAD, M.; FARKHONDEH, T.; SAMINI, F. Anti-oxidative effects of curcumin on immobilization-induced oxidative stress in rat brain, liver and kidney. **Biomed. pharmacother.**, v.87, p.223-229, 2017.

SAMPEY et al. Cafeteria diet is a robust model of human metabolic syndrome with liver and adipose inflammation: comparison to high-fat diet. **Obesity (Silver Spring)**, v. 19, n. 6, p. 1109-1117, jun. 2011.

SCARANO, A.; BUTELLI, E.; DE SANTIS, S.; CAVALCANTI, E. ; HILL, L. ; DE ANGELIS, M.; GIOVINAZZO, G.; CHIEPPA, M.; MARTIN, C.; SANTINO, A. Combined Dietary Anthocyanins, Flavonols, and Stilbenoids Alleviate Inflammatory Bowel Disease Symptoms in Mice. **Frontiers in Nutrition**, v.4, p. 75–, 2018.

SHEETHAL, S., RATHEESH, M., JOSE, SP et al. Anti-Ulcerative Effect of Curcumin-Galactomannoside Complex on Acetic Acid-Induced Experimental Model by Inhibiting Inflammation and Oxidative Stresslo, **Inflammation.**, v. 43, p.1411–1422, 2020.

SOARES, E. R.; MONTEIRO, E. B.; SILVA, R. C.; BATISTA, A.; SOBREIRA, F.; MATTOS, T. ET AL. Compostos bioativos em alimentos, estresse oxidativo e inflamação: uma visão molecular da nutrição. **Revista HUPE**, v. 14, n. 3, p. 64-72, jul./set. 2015.

UNG, V.Y.L., FOSHAUG, R. R., MACFARLANE, S. M. et al. Oral Administration of Curcumin Emulsified in Carboxymethyl Cellulose Has a Potent Anti-inflammatory Effect in the IL-10 Gene-Deficient Mouse Model of IBD. **Dig. dis. sci.**, v.55, p.1272–1277, 2010.

YUAN J, LIU R, MA Y, ZHANG Z, XIE Z. Curcumin Attenuates Airway Inflammation and Airway Remolding by Inhibiting NF- κ B Signaling and COX-2 in Cigarette Smoke-Induced COPD Mice. **Inflammation**. v.41, n.5, p.1804-1814. 2018.

ZAHEDIPOUR, F.; HOSSEINI, S. A.; SATHYAPALAN, T.; MAJEED, M.; JAMIALAHMADI, T.; AL-RASADI, K.; BANACH, M.; SAHEBKAR, A. Potential effects of curcumin in the treatment of COVID -19 infection. **Phytother. res.**, v. 34, n. 11, 2020.

ARTIGO 3

THE CURCUMIN POTENTIAL: A REVIEW OF THE CHARACTERIZATION, FUNCTION AND MECHANISM OF ACTION IN INFLAMMATORY BOWEL DISEASE

ABSTRACT

Inflammatory Bowel Disease (IBD) is a chronic inflammatory condition of the gastrointestinal tract. Brazil still has a low prevalence of the disease; however, the incidence has been increasing annually. Many patients do not respond well to therapies or have a response that is not sustained. Thus, additional treatment options with new mechanisms of action are needed to increase efficacy rates. Recent studies have indicated that curcumin, a bioactive compound extracted from turmeric (*Curcuma longa*), with antioxidant and anti-inflammatory properties, can help to attenuate the inflammatory cascade involved in inflammatory bowel diseases, thus improving the function of the intestinal barrier and potentially the clinical results. This review addresses the potential of curcumin, present in *Curcuma longa*, which potentially regulates the expression of target genes in the process of inflammatory bowel disease. Studies have confirmed that curcumin in the diet have protective and therapeutic effects in the management of IBD mediated by the negative regulation of cytokines and inflammatory enzymes, increasing antioxidant defense by suppressing inflammatory pathways and their cellular signaling mechanisms.

Keywords: curcumin, inflammation, oxidative stress, treatment, natural products, cytokines. **1.**

1. INTRODUCTION

Inflammatory Bowel Diseases (IBD) are a group of inflammatory diseases that affect the gastrointestinal tract. They can occur through two main forms, Crohn's Disease (CD) and Ulcerative Colitis (UC). CD can present inflammation in any segment of the gastrointestinal tract, including the mouth and esophagus, although it is more commonly limited to the ileum region. However, UC is characterized by a continuous segment of inflamed tissue, specifically in the colon and, more often, in the distal or rectum (13, 17).

The etiology of IBD is not fully understood, and many hypotheses have been proposed to explain the pathogenesis, from infectious to psychosomatic, social, metabolic, vascular, genetic, allergic, autoimmune and immunomediated mechanisms (4, 41). At present, there is a general consensus that IBD occurs in genetically predisposed individuals, which has a dysfunctional intestinal epithelium barrier and increased permeability of the narrow junction. Under these conditions, patients develop an exaggerated immune response in the intestine directed to the intestinal microbiota, this response cannot be controlled and leads to chronic intestinal inflammation (3). When the inflammatory balance is altered with excessive pro-inflammatory signs, physiological damage can occur (25).

Chronic inflammation in IBD is characterized by infiltration of mononuclear cells, such as macrophages or lymphocytes, which promote the overexpression of target genes, through the release of nuclear factor Kappa B (NF- κ B), pro-inflammatory cytokines, tumor necrosis factor (TNF- α) and interleukins (IL-1 β and IL-6) (44). These activations produce not only the pro-inflammatory substances mentioned above, but also an excessive amount of reactive oxygen (ROS) and nitrogen (RNS) species. Significantly, the alteration of the redox balance in the intestinal mucosa, due to the excess of oxidative reactions, has a central role in the expression and progression of IBD, maintaining the active inflammation in the intestinal mucosa (20).

The conventional treatment options used for IBD are based on strategies to decrease the exacerbated immune response and interfere in multiple stages of the inflammatory cascade (36). These treatments are expensive, often involve significant side effects, and are limited in effectiveness and specificity. Many patients do not respond to therapies or have an unsustainable response (44). As a result, there is a clear demand for safe and effective therapeutic strategies for human IBD, where it is suggested that bioactive plant compounds, with antioxidant and anti-inflammatory function, may provide, through food, an alternative treatment option or supplementary, to patients with IBD (26).

Extracts of the species *Curcuma longa* L. have been shown to have a diversity of phenolic compounds. The main compound, derived from *Curcuma longa* L. already known in the literature, is curcumin, and has antioxidant, antimicrobial, anti-inflammatory, antiangiogenic, antimutagenic, antiplatelet properties, in addition to having a protective, preventive and therapeutic effect against various human diseases, including osteoarthritis, cancer, dyslipidemia, metabolic syndrome, hyperuricemia, liver disease, anxiety, diabetes, lung disorders, dermatological disorders, among others (21, 31, 34, 35). In addition, it is commonly assumed that curcumin has also been suggested for the treatment of digestive diseases, such as inflammatory bowel diseases (21, 44).

Clarifying the pathways is extremely important to allow the development of new therapeutic alternatives for treatment and / or prevention. Thus, the present study was based on a literature review that aimed to highlight recent aspects of the effect of curcumin on the treatment of IBD and the mechanisms of the biochemical pathways involved (25, 37).

2. CURCUMIN

Saffron has curcumin pigments that are phytonutrients, polyphenolic compounds, with antioxidant function and anti-inflammatory effects on health (10, 42). Saffron extract is mainly composed of: 77% curcumin, 17% demethoxycurcumin and 3% bisdesmethoxycurcumin (Figure 1), as well as volatile oils (tumerone, atlantone and zingiberone), sugars, proteins and resins (2, 42).

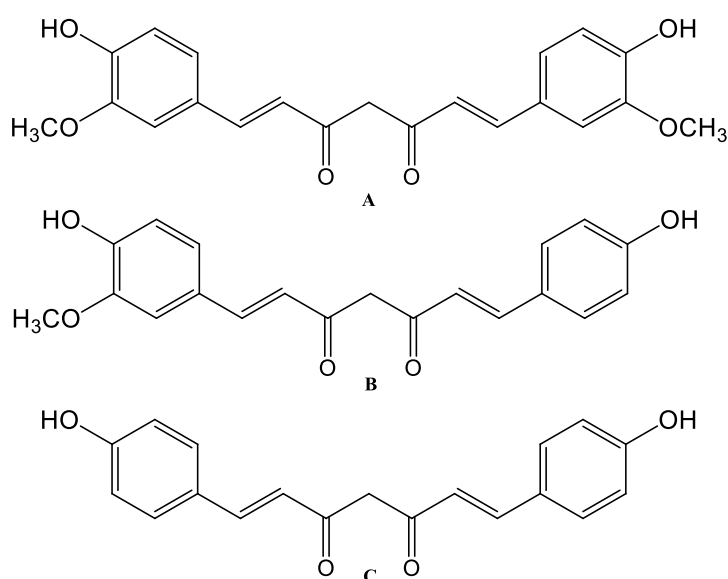


Figure 1. Chemical structures of Curcumin, (A), Demethoxycurcumin (B) and Bisdesmethoxycurcumin (C).

Curcumin (diferuloylmethane), also known as turmeric, is the most active component of the *Curcuma longa* L. plant, belonging to the Zingiberaceae family, commonly used as a natural food additive (10). Curcumin (molecular mass of 368.38 g / mol and melting point of 179-183°C), presents yellow pigment, identified as the main active component obtained from the dry rhizome of the plant, which acts mainly in the inflammatory pathways and has antioxidant action (5, 42).

Improved and advanced curcumin extraction methods are still being described, even after two centuries. The methods used for quantification include thin layer chromatography with UV detection (CCD / UV), high performance liquid chromatography with UV detection (HPLC / UV) and liquid chromatography coupled to the mass spectrometer (LC / MS) (40). Of organic solvents used, it was found that ethanol is the most suitable solvent for extracting curcumin. Although chlorinated solvents extract curcumin very efficiently, from saffron, they are not commonly used due to its non-acceptance in the food industry, due to its toxicity (33). The yield of curcumin extraction from dry rhizome varies according to the extractive method used in the process (table 1). Thus, it is known that microwave assisted extraction and pulse ultrasound methods are better than continuous methods (33,40).

Table 1: Extraction of curcumin in the rhizome of *Curcuma longa*

Yield of curcumin%	Extraction method	Extraction time (min)
2,1 ± 0,1	Soxhlet assisted extraction	480
48,57	Microwave assisted extraction (MAE) + extraction solvent (ES) (ethanol)	5
68,57	MAE + ES (acetone)	5
57,14	MAE + Immersion solvent (IS) (ethanol) + ES (ethanol)	5
67,01	MAE + IS (water) + ES (ethanol)	5
90,69	MAE + IS (water) + ES (acetona)	5
32,85	Ultrasound-assisted extraction (UAE) + SE (ethanol)	5
40,00	UAE + ES (acetona)	5
66,66	UAE + IS (water) + ES (ethanol)	5
71,42	UAE + IS (water) + ES (acetona)	5
69,37	Supercritical carbon dioxide extraction + ES (ethanol)	240

Source: Wakte et al (2011), adapted by the authors.

Previous studies demonstrate that curcumin has an immense therapeutic potential due to the pleiotropic characteristic of the molecule, which allows it to have important properties that are being studied and used for the treatment of various diseases through antioxidant, anti-apoptotic and anti-inflammatory properties (13, 16, 34). It is also commonly assumed that curcumin has been considered a potential treatment in digestive diseases, such as IBD, which are chronic progressive diseases defined as autoimmune diseases, implicated in aberrant and persistent inflammation of the intestine, which affects the gastrointestinal tract (2, 31).

From clinical studies conducted with humans, it has been determined that curcumin is safe and effective. The FDA (Food and Drug Administration) has confirmed that curcumin is a compound "generally recognized as safe" (28,34). In recent years, dietary polyphenols, such as curcumin, have gained a lot of attention as complementary and alternative medicine, due to their higher safety index (12g per day), and to the beneficial therapeutic effects attributed

through the multiple targeting of the molecular pathways involved in multifaceted pathologies (38).

Curcumin has a wide range of biological properties and pharmacological actions, suggesting interesting clinical applications. But researchers must deal with the other side of the coin, that is, low bioavailability, low solubility ($<1 \mu\text{g} / \text{ml}$ at pH 7.3), and consequently low absorption, in addition to extensive intestinal and hepatic metabolic transformation, rapid metabolic elimination by reduction and conjugation, thus causing limitations to clinical applications (38, 45).

Therefore, some strategies have been used in order to increase the bioavailability of curcumin. Among them, it is possible to observe the administration of curcumin associated with piperine (8), curcumin in liposomes, micelles, nanoparticles and structural analogs (8, 38).

2.1. Curcumin and Intestinal Inflammation: Mechanisms of action

Both kappa nuclear factor B (NF- κ B) and activating protein 1 (AP-1) and mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathways are believed to play a role in inflammatory bowel diseases. (13, 23). NF- κ B and AP-1 are pro-inflammatory transcription factors, activated in all inflammatory diseases, which bind and activate co-activating molecules, controlling the transcription of genes for most inflammatory, differentiating, proliferative and apoptotic factors (7). When the inflammatory balance is altered, with excessive pro-inflammatory signs, physiological damage can occur.

NF- κ B is probably the dominant transcription factor involved in inflammatory bowel diseases. In unstimulated cells, NF- κ B is located in the cytoplasm, in the form of dimers, linked to inhibitory molecules of the kappa B protein (I κ B) family that keep proteins inactive. Stimulation of the NF- κ B signaling pathway can occur by connecting a binder to a cellular surface receiver, such as the TNF- α receptor (TNF-R) and the Toll-like receptor (TLR-4), which can be activated by both lipopolysaccharides (LPS) and saturated fatty acids (13). Once stimulated, the specific kinase complex (IKK) is activated, which will phosphorylate the I κ B proteins, signaling their ubiquitination and degradation by proteasomes and after release into the cytoplasm, NF- κ B proteins can translocate to the nucleus to bind to DNA promoters and initiate the transcription of inflammatory genes, such as IL-1 β , IL-12, inducible nitric oxide synthase (iNOS), cyclooxygenase-2 (COX-2), IL-23 and IL-6, as well as genes related to the function and activation of T cells. IKK can be activated by cytokines, microbial components, cell stress, among others (7, 29). It is no accident that NF- κ B is an important target for therapeutic intervention in IBD (1). Thus, a pathway for curcumin treatment is through the

negative regulation of NF- κ B signaling, through the IKB, which is able to translocate to the nucleus and negatively regulate the binding of NF- κ B to DNA promoters (7, 22). Curcumin also inhibits the production of inflammatory cytokines: TNF- α , interleukins (IL-1, IL-2, IL-6, IL-8 and IL-12) and monocyte chemotactic protein -1 (MCP-1) (20, 45). (Figure 2).

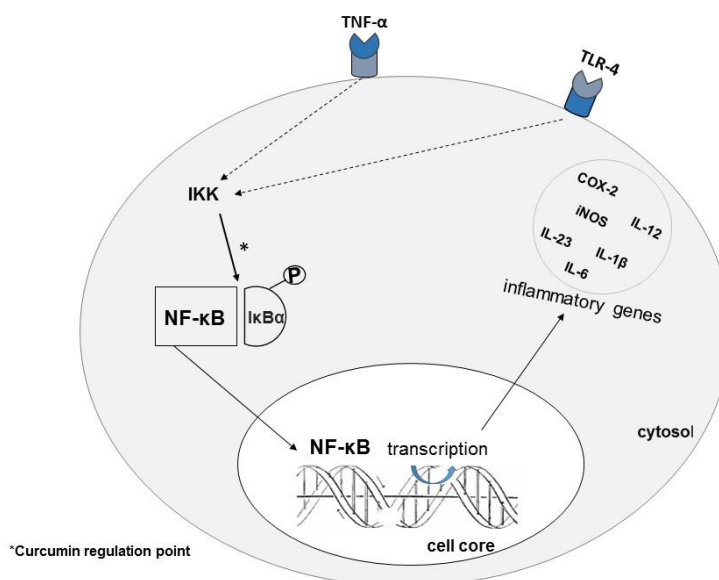


Figure 2. Signaling pathway of the NF- κ B transcription factor. Activation of this pathway results in increased expression of proteins involved in IBD that can be regulated by curcumin.

Studies show that curcumin is able to inhibit phosphorylation and degradation of IKB, induced by tumor necrosis factor alpha (TNF- α), which indicates that this bioactive compound acts in stages that precede IKB phosphorylation (7). Curcumin can then suppress the activation of NF- κ B, thereby regulating pro-inflammatory gene expression, inhibiting the transcription of, for example, COX-2 and iNOS and consequently reducing the progression of IBD (7, 29).

IBD is also associated with high levels of cyclooxygenase. COX-2 is induced by cytokines (IL-1, IL-2 and TNF) and by mediators at sites of inflammation, such as growth factors and endotoxins, at transcriptional or post-transcriptional levels. However, with the exception of the involvement of the transcription factor AP-1 and mitogen-activated protein kinase p38 (p38-MAPK), the mechanisms for regulating COX-2 in enterocytes remain unknown (39). Studies show that curcumin is highly pleiotropic, being a molecule capable of interacting with numerous target molecules involved in inflammation, modulating the inflammatory response by the negative regulation of enzyme activity: COX-2, lipoxygenase and iNOS. In an animal model for inflammation, curcumin inhibited the metabolism of

arachidonic acid in the study of mouse epidermal inflammation, through the negative regulation of cyclooxygenase and lipoxygenase pathways (2, 39). (Sharma et al. 2019) studying animal model with colitis induced by sodium dextran sulfate (DSS), treated with solid binary lipid nanoparticles, loaded with curcumin, found a significant reduction in leukocyte infiltration, oxidative stress and secretion of inflammatory cytokine TNF- α . The AP-1 pathway is similar to the NF- κ B pathway and can be stimulated by the toll-like receptor 4 (TLR4), which is activated by lipopolysaccharides (LPS), growth factors, reactive oxygen species, inflammatory cytokines and cell stress generalized. AP-1 is a set of homodimeric and heterodimeric complexes of the Fos and Jun families (6). Activation of the Jun N-terminal kinases (JNK) and ERK (extracellular signal regulated kinases) pathways of the MAP kinases cascade (MAPK - mitogen activated protein kinases), causes the AP1 pathway to be activated and binding to the promoter region in target genes (11). Curcumin acts by inhibiting the activation of JNK and consequently inhibits the activation of the AP-1 complex (6, 11). In in vitro assays, it was observed that curcumin effectively inhibits the activation of the JNK pathway in cells stimulated by TNF- α . Therefore, indicating one of the possible mechanisms for suppression of AP-1 signaling pathways by this compound (11, 13).

Several studies provide evidence that the mucosal surface epithelium of the gastrointestinal tract plays a critical role as defensive frontline of the innate immune system (30). Studies demonstrate that several intestinal epithelial cell lines constitutively express several members of a new family of transmembrane receptors, called TLR receptors, which can serve as a major link between the innate immune response and the adaptive immune response in the mucosa (18).

LPS, a component of the outer membrane of gram-negative bacteria, triggers the inflammatory response, linking its cognate receptors to the surface of the sensory cells of the innate immune system (macrophages), stimulating the synthesis of pro-inflammatory molecules. Enterocytes, like many other cell types, can be sensitive to LPS (43). It is known that LPS is continuously produced in the intestinal lumen by intestinal bacteria and an intact intestinal epithelial barrier restricts the translocation of this luminal LPS into the systemic circulation (43). The luminal LPS is assigned to the breakdown of the intestinal barrier, in addition to the activation of intestinal epithelial cells (IEC), it also stimulates intestinal macrophages to produce pro-inflammatory cytokines, such as TNF- α , IL-1 β and interferon-gamma (IFN - γ) which in turn can initiate pro-inflammatory signaling by increasing MAPK p38 phosphorylation and light chain myosin kinase (LCMK) expression, which results in

rupture of intestinal junctions and increased intestinal permeability (15,30). A western type diet, rich in fat and cholesterol and low in fruits and vegetables increases intestinal permeability, leading to increased plasma LPS levels (43).

Epstein et al. 2010 evaluated the effect of curcumin on levels of mitogen-activated p38 protein kinase (p38 MAPK), IL-1 β , IL-10 and matrix-3 metalloproteinase (MMP-3) in the intestines of children and adults with inflammatory bowel disease. Biopsies of the colonic mucosa and colonic myofibroblasts, from children and adults with active IBD, were treated with curcumin, and the results indicated suppression in the activation of p38 MAPK, reduction in IL-1 β and increase in IL-10 levels. Suskind et al. 2013, in a pilot study with 10 patients with IBD receiving curcumin of 1000-1600 mg per day, it was possible to observe that half of them showed a significant reduction in both symptoms and inflammatory indices. Corroborating with previous studies, an in vitro study showed the ability of curcumin to increase the expression of anti-inflammatory cytokines (IL-10), reducing inflammation associated with IBD (1, 23, 43).

Although direct contact between luminal bacteria and intestinal epithelial cells is restricted by the presence of a tightly adherent mucin layer, LPS derived from bacteria can not only activate CIS, but also activate intestinal macrophages leading to the production of pro-mediators. inflammatory diseases such as IL-1 β . Curcumin then acts, promoting a balance of the mucosa, via inhibition of IL-1 β and IL-1Ra and regulates inflammatory bowel diseases in humans and animals (43). In rabbits with ulcerative colitis, the synthesis of IL-1 in the colon occurs at the beginning of the inflammatory disease and the IL-1 levels correlates with the degree of tissue inflammation. And it was observed that IL-1Ra levels in the colon were elevated 10 times above those of IL-1 (18).

Inflammatory bowel diseases are defined, in part, by an altered microbiota, often consisting of pathogenic bacteria (4, 25). In these cases, the intestinal microbiota is often enriched by an invasive and adherent *E. coli* population, which can promote inflammation in the intestine. Curcumin is able to regulate the intestinal microbiota as a whole (24). In addition, the studies of (Niamsa and Sittiwet, 2009) confirmed the antimicrobial activity of curcumin against several gram-negative and gram-positive pathogenic bacteria, commonly found in our body. It is important to note that curcumin also favors the maintenance of beneficial bacteria, known to provide protection to the intestinal mucosa and to inhibit intestinal inflammation through the production of short-chain fatty acids (30).

Thus, highlighting butyrate, known for its beneficial role in the immunomodulation of regulatory T cells, is a short-chain fatty acid produced by commensal bacteria and increases the

function of the intestinal epithelium barrier. The metabolism of butyrate in the host leads to an environment less conducive to intestinal dysbiosis (7). Ohno et al. 2017, studying a model of colitis in mice, observed an immunological and microbiological change in order to improve the function of the intestinal barrier and reduce intestinal inflammation, with the supplementation of curcumin nanoparticles. The administration of curcumin in these mice significantly increased the butyrate-producing microbiota, associated with the colonic induction of Tregs, tolerance-promoting T cells.

It is also known that intestinal microbial metabolites affect intestinal motility through indirect influences on serotonin production, a process that can influence the development or progression of IBD (43).

3. CONCLUSIONS

We have evidence that curcumin, through interaction with a diverse set of cellular and molecular targets, has an anti-inflammatory role and, therefore, can be considered as a valuable natural compound for the IBD control. (Figure 3).

The discussion of different studies allows gathering a variety of information on the mechanisms of action of bioactive compounds. These mechanisms may explain the individual or synergistic effect of capturing free radicals and inhibiting the inflammatory cascade found with ingesting curcumin.

More research is needed to better understand and judge its uses in clinical practice. In addition, with regard to the bioavailability of its constituents and drug administration systems, it is suggested the development of modern formulations (for example, nanoparticles, liposomes and microspheres) and the evaluation of their effectiveness. It can be concluded that curcumin is recommended in diets to combat a wide variety of diseases by inhibiting the activation of the NF- κ B and AP-1 pathways.

The biological effects of curcumin in inflammatory bowel disease are mediated by different pathways. Abbreviations: NF-B: kappa B nuclear factor; ROS: radical oxygen species; iNOS: inducible nitric oxide synthase; AP-1: Activator protein 1; MAPK: Mitogen-Activated Protein Kinase; MLCK: Myosin Light-Chain Kinase.

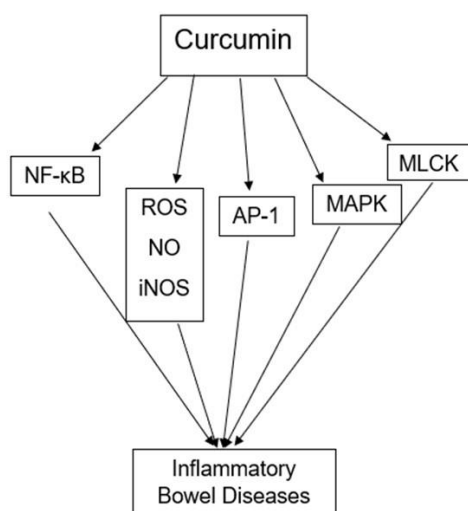


Figure 3. Main biological effects of curcumin in inflammatory bowel disease.

4. REFERENCES

1. Ahmad, R., M. B. Hussain, M. T. Sultan, M. S. Arshad, M. Waheed, et al. 2020. Biochemistry, Safety, Pharmacological Activities, and Clinical Applications of Turmeric: A Mechanistic Review. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2020(7656919): 14.
2. Ansar, S., S. Jilani, H. Abbasi, M. Siraj, A. Hashimi, et al. 2020. *Curcuma longa*: A treasure of medicinal properties. *CELLMED*. 10(2):9.1-9.7.
3. Arnott, I., G. Rogler, and J. O. Halfvarson. 2018. Management of Inflammatory Bowel Disease in the Elderly: Current Evidence and Future Perspectives. *Inflammation*. *Intest. Dis.* 2:189–199.
4. Axelrad, J. E., K. H. Cadwell, J. F. Colombel, and S. C. Shah. 2021. The role of gastrointestinal pathogens in inflammatory bowel disease: a systematic review. *Therapeutic Advances in Gastroenterology*. 14.
5. Basnet, P. and N. Skalko-Basnet. 2011. Curcumin: an anti-inflammatory molecule from a curry spice on the path to cancer treatment. *Molecules*. 6(6): 4567–4598.
6. Bastos, D. H. M., M. M. Rogero, and J. A. G. Arêas. 2009. Mechanisms of action of bioactive compounds in foods in the context of inflammatory processes related to obesity. *B. Arc. of Endocrinology & Metabolism*. 53(5): 646-656.

7. Burge, K., A. Gunasekaran, J. Eckert, and H. Chaaban. 2019. Curcumin and Intestinal Inflammatory Diseases: Molecular Mechanisms of Protection. *Int. J. Mol. Sci.* 20(8): 1912.
8. Chakraborty, M., A. Bhattacharjee, and J. V. Kamath. 2017. Cardioprotective effect of curcumin and piperine combination against cyclophosphamide-induced cardiotoxicity. *Indian journal of pharmacology.* 49(1): 65–70.
9. Cheng, C., S. Penga, Z. Liab, L. Zoua, W. Liu, et al. 2017. Improved bioavailability of curcumin in liposomes prepared using a pH-driven, organic solvent-free, easily scalable process. *RSC Advances.* 7: 25978-25986.
10. Cortez, M. V., N. R. Perovic, E. A. Soria, and M. D. Defagó. 2020. Effect of heat and microwave treatments on phenolic compounds and fatty acids of turmeric (*Curcuma longa* L.) and saffron (*Crocus sativus* L.). *Brazilian Journal of Food Technology.* 23: e2019205.
11. Fujioka, S., J. Niu, C. Schmidt, G. M. Sclabas, B. Peng, et al. 2004. NF-kappaB and AP-1 connection: mechanism of NF-kappaB-dependent regulation of AP-1 activity. *Molecular and cellular biology.* 24(17): 7806–7819.
12. Goel A., A. B. Kunnumakkara, and B. B. Aggarwal. 2018. Curcumin as "Curecumin": from kitchen to clinic. *Biochemical pharmacology.* 75(4): 787–809.
13. Graham, D. B., and R. J. Xavier. Pathway paradigms revealed from the genetics of inflammatory bowel disease. *Nature.* 578(7796):527–539, 2020.
14. Jakubczyk, K., A. Drużga, J. Katarzyna, and K. Skonieczna-Żydecka. 2020. Antioxidant Potential of Curcumin: A Meta-Analysis of Randomized Clinical Trials. *Antioxidants.* 9: 1092.
15. Jiang, S., J. Hanb, T. Lid, Z. Xind, Z. Ma, et al., 2017. Curcumin as a potential protective compound against cardiac diseases. *Pharmacological research.* 119, 373–383.
16. Jurenka, J. S. 2009. Anti-inflammatory properties of curcumin, a major constituent of *Curcuma longa*: a review of preclinical and clinical research. *Altern Med Rev.* 14(2):141–153.
17. Juritsch, A F. and Moreau, R. 2018. Role of soybean-derived bioactive compounds in inflammatory bowel disease. *Nutrition Reviews.* 76(8): 618-638.
18. Katherine A., J. Fitzgerald, and C. Kagan. 2020. Toll-like Receptors and the Control of Immunity, *Cell.* 180(6):1044-1066.

19. Khaerunnisa, S., H. Kurniawan, R. Awaluddin, S. Suhartati, and S. Soetjipto. 2020. Potential Inhibitor of COVID-19 Main Protease (Mpro) From Several Medicinal Plant Compounds by Molecular Docking Study. Preprints. 2020030226.
20. Khare, T.; S. S. Palakurthi, B. M. Shah, B. S. Palakurthi, and S. Khare. 2020. Natural Product-Based Nanomedicine in Treatment of Inflammatory Bowel Disease. *Int. J. Mol. Sci.* 20: 3956.
21. Lima, E. P., O.H. Gonçalves, F. Q. Ames, L.V. Castro-Hoshino, F. V. Leimann. 2021. Anti-inflammatory and Antioxidant Activity of Nanoencapsulated Curcuminoids Extracted from *Curcuma longa* L. in a Model of Cutaneous Inflammation. *Inflammation.* 44: 604–616.
22. Liu, Z., J. Liu, L. Zhao, H. Geng, J. Ma, et al. 2017. Curcumin reverses benzidine-induced epithelial-mesenchymal transition via suppression of ERK5/AP-1 in SV-40 immortalized human urothelial cells. *International Journal of Oncology.* 50: 1321-1329.
23. Lu, J., X. Liu, Y. Liao, D. Wang, J. Chen, et al. 2018. Formula Regulates Inflammatory Cytokines Production in 5/6 Nephrectomized Rats via Suppression of NF- κ B Activation. *Evidence-based complementary and alternative medicine.* 1-7.
24. Maslowski, K M., A. T. Vieira, A. Ng, J. Kranich, F. Sierro, et al et al. 2019. Regulation of inflammatory responses by gut microbiota and chemoattractant receptor GPR43. *Nature.* 461(7268): 1282–1286.
25. Monteleone, G. and Ardizzone S. 2020. Are patients with inflammatory bowel disease at increased risk for Covid-19 infection?. *Journal of Crohn's & colitis.* 14(9): 1334–1336.
26. Nascimento, R. P., A. M. T. M. Moya, A. P. F. Machado, M. V. Geraldi, P. Diez-Echave, et al. 2021. Review on the potential application of non-phenolic compounds from native Latin American food byproducts in inflammatory bowel diseases, *Food Research International.* 139: 109796.
27. Ohno, M., A. Nishida, Y. Sugitani, K. Nishino, O. Inatomi, et al. 2017. Nanoparticle curcumin ameliorates experimental colitis via modulation of gut microbiota and induction of regulatory T cells. *PloS one.* 2(10). e0185999.
28. Patil, B. S., G. K. Jayaprakasha, K. N. C. Murthy, and A. Vikram. 2009. Bioactive compounds: historical perspectives, opportunities, and challenges. *Journal of agricultural and food chemistry.* 57(18): 8142–8160.

29. Paulis, G. 2018. Inflammatory mechanisms and oxidative stress in prostatitis: the possible role of antioxidant therapy. *Research and Reports in Urology*.10:75–87.
30. Pelaseyed, T., J. H. Bergström, J. K. Gustafsson, A. Ermund, G.M. H. Birchenough, et al. 2014. The mucus and mucins of the goblet cells and enterocytes provide the first defense line of the gastrointestinal tract and interact with the immune system. *Immunological reviews*. 260(1): 8–20.
31. Peng Y., M. Ao, B. Dong, Y. Jiang, L. Yu L, et al. 2021. Anti-Inflammatory Effects of Curcumin in the Inflammatory Diseases: Status, Limitations and Countermeasures. *Drug Des Devel Ther*. 15:4503-4525.
32. Peng, S., Z. Li, L. Zou, W. Liu, and C. Liua. 2018. Improving curcumin solubility and bioavailability by encapsulation in saponin-coated curcumin nanoparticles prepared using a simple pH-driven loading method. *Food & function*. 9(3): 1829–1839.
33. Priyadarsini, K. I. 2014. The chemistry of curcumin: from extraction to therapeutic agent. *Molecules*. 19(12): 20091–20112.
34. Razavi, B. M., M. Ghasemzadeh Rahbardar, and H. Hosseinzadeh. 2021. A review of therapeutic potentials of turmeric (*Curcuma longa*) and its active constituent, curcumin, on inflammatory disorders, pain, and their related patents. *Phytotherapy Research*. 1-25.
35. Sadeghi, A., A. Rostamirad, S. Seyyedebrahimi, and R. Meshkani. 2018. Curcumin improves palmitate-induced inflammation in skeletal muscle cells by regulating the JNK / NF- κ B pathway and ROS production. *Inflammopharmacology*. 26:1265-1272.
36. Scarano, A., E. Butelli, S. De Santis, E. Cavalcanti, L. Hill, et al. 2018. Combined Dietary Anthocyanins, Flavonols, and Stilbenoids Alleviate Inflammatory Bowel Disease Symptoms in Mice. *Frontiers in Nutrition*. 4: 75.
37. Serrano, A., G. Ros, and G. Nieto. 2018. Bioactive Compounds and Extracts from Traditional Herbs and Their Potential Anti-Inflammatory Health Effects. *Medicines*. 5(3):76.
38. Sharma, M., S. Sharma, and J. Wadhwa. 2019. Improved uptake and therapeutic intervention of curcumin via designing binary lipid nanoparticulate formulation for oral delivery in inflammatory bowel disorder. *Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology*. 47(1): 45–55.

39. Surh, Y.J., K.S. Chun, H.H. Cha, S. S. Han, Y.S. Keum, et al. 2021. Molecular mechanisms underlying chemopreventive activities of anti-inflammatory phytochemicals: down-regulation of COX-2 and iNOS through suppression of NF-kappa B activation. *Mutation research*. 480-481: 243–268.
40. Syed, H.K., K. B. Liew, G. O. K. Loh, and K. K. Peh .2015. Stability indicating HPLC-UV method for detection of curcumin in *Curcuma longa* extract and emulsion formulation. *Food chemistry*. 170: 321–326.
41. Vasovic, M., N. Gajovic, D. Brajkovic, M. Jovanovic, N. Zdravkovaic, et al. 2016. The relationship between the immune system and oral manifestations of inflammatory bowel disease: a review. *Central-European journal of immunology*. 41(3): 302–310.
42. Vishwas, S., M. Gulati, Monica, K. Bhupinder, G. Saurabh, et al. 2021. Expanding the Arsenal Against Huntington's Disease-Herbal Drugs and Their Nanoformulations. *Current Neuropharmacology*. 19(7): 957-989(33).
43. Wang, J., S.S. Ghosh, and S.Ghosh. 2017. Curcumin improves intestinal barrier function: modulation of intracellular signaling, and organization of tight junctions. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. 312(4): C438–C445.
44. Zhang, J., Y. Zhao, T. Hou, H. Zeng, H. D. Kalambe, et al. 2020. Macrophage-based nanotherapeutic strategies in ulcerative colitis. *J. of Controlled Release*. 320: 363-380.
45. Zhongfa, L., M. Chiu, J. Wang, W. Chen, W. Yen, et al. 2012. Enhancement of curcumin oral absorption and pharmacokinetics of curcuminoids and curcumin metabolites in mice. *Cancer chemotherapy and pharmacology*. 69(3): 679–689.

CONCLUSÃO GERAL

O desenvolvimento do gel transdérmico de curcumina colabora para uma melhor biodisponibilidade, absorção e conseqüentemente um tratamento mais eficiente da DII. Em relação ao desequilíbrio redox, este tem sido proposto como um mecanismo subjacente à fisiopatologia da DII, temos que o GTC foi capaz de atenuar o estresse oxidativo causado pela inflamação intestinal, sendo pela eliminação dos EROs por ação direta na desintoxicação de radicais oxidantes, exercendo efeito sinérgico junto das enzimas endógenas ou por promover aumento das enzimas antioxidantes endógenas.

Foi evidenciado no intestino delgado o efeito benéfico do GTC de concentrações (100, 200 e 400 mg) ao observar o aumento da sua camada muscular e ao notar o aumento na espessura do epitélio das vilosidades na concentração de 200 mg de curcumina. No ceco, o GTC foi eficaz em aumentar a profundidade da cripta na concentração de 400 mg de curcumina. Tais efeitos do GTC revelam sua função no restabelecimento da estrutura histológica de um animal sadio.

Outro dado interessante é que a curcumina foi testada para a linhagem celular HT29 (adenocarcinoma colorretal humano) e o índice de seletividade (IS) obtido foi de 14,0. (SILVA, 2021). Essa informação apoia os nossos achados uma vez que a DII se divide em dois tipos mais comuns: doença de Crohn (DC) e colite ulcerosa (CU). Sabe-se que pacientes com CU e DC, enfrentam um risco aumentado para o desenvolvimento do câncer colorretal. Assim, o uso do gel transdérmico de curcumina além de atuar na DII também funciona como um coadjuvante na prevenção desse tipo de câncer.

Esses resultados se somam aos recentemente encontrados na literatura e corroboram com a afirmação de que a curcumina é uma importante e segura opção de tratamento adjuvante no abrangente problema de saúde pública: Doença Inflammatory Intestinal e suas complicações.

ANEXO A - Aprovação do projeto pelo Comitê de Ética no Uso de Animais –
CEUA/UFV

CERTIFICADO

A Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA/UFV certifica que o processo nº 41/2019, intitulado **“Avaliação da atividade anti-inflamatória e antioxidante de derivado sintético de dibenzoilmetano e da curcumina em modelos para doença inflamatória intestinal”**, coordenado pela professora Marisa Alves Nogueira Diaz do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, está de acordo com a Legislação vigente (Lei Nº 11.794, de 08 de outubro de 2008), as Resoluções Normativas editadas pelo CONCEA/MCTI, a DBCA (Diretriz Brasileira de Prática para o Cuidado e a Utilização de Animais para Fins Científicos e Didáticos) e as Diretrizes da Prática de Eutanásia preconizadas pelo CONCEA/MCTI, portanto sendo aprovado por esta Comissão em 02/12/2019, com validade de 12 meses.

CERTIFICATE

The Ethic Committee in Animal Use/UFV certify that the process number 41/2019, named **“Evaluation of anti-inflammatory and antioxidant activity of synthetic dibenzoylmethane derivative and turmeric in models for inflammatory bowel disease”**, is in agreement with the actual Brazilian legislation (Lei Nº 11.794, 2008), Normative Resolutions edited by CONCEA/MCTI, the DBCA (Brazilian Practice Guideline for the Care and Use of Animals for Scientific Purposes and Teaching) and the Guidelines of Practice the Euthanasia recommended by CONCEA/MCTI therefore being approved by the Committee on December 02, 2019 valid for 12 months.



Prof. Silvia Almeida Cardoso

Presidente

Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/UFV