

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS - CAMPUS A.C. SIMÕES
INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA - IQB
CURSO DE QUÍMICA LICENCIATURA

Glenn Côsallin Melquiades da Conceição

Avaliação da ação do extrato de *Curcuma longa* sobre a resposta antioxidante e anti-inflamatória nos tecidos hepático e renal de camundongos com colite ulcerativa moderada e grave induzida por sulfato de sódio dextrana.

Maceió - AL

2021

Glenn Côsallin Melquiades da Conceição

Avaliação da ação do extrato de *Curcuma longa* sobre a resposta antioxidante e anti- inflamatória nos tecidos hepático e renal de camundongos com colite ulcerativa moderada e grave induzida por sulfato de sódio dextrana.

Trabalho Conclusão do Curso de Graduação em Química Licenciatura do Instituto de Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas como requisito para a obtenção do título de Licenciada em Química.
Orientadora: Prof. Dra. Marília Oliveira Fonseca Goulart
Co-orientador: Dr. Orlando Roberto Pimentel de Araújo

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central

Bibliotecário: Cláudio César Temóteo Galvino – CRB4/1459

C744a Conceição, Glenn Cósallin Melquiades da.

Avaliação da ação do extrato de *Curcuma longa* sobre a resposta antioxidante e anti-inflamatória nos tecidos hepático e renal de camundongos com colite ulcerativa moderada e grave induzida por sulfato de sódio dextrana / Glenn Cósallin Melquiades da Conceição. – 2021.

55 f.: il.

Orientador: Marília Oliveira Fonseca Goulart.

Co-orientador: Orlando Roberto Pimentel de Araújo.

Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Química : Licenciatura) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Química e Biotecnologia. Maceió, 2021.

Bibliografia: f. 50-55.

1. Manifestações extra intestinais. 2. Planta medicinal. 3. Doença gastrointestinal.
I. Título.

CDU: 633.88:616.34

Folha de Aprovação

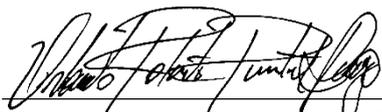
Glenn Côsallin Melquiades da Conceição

Avaliação da ação do extrato de *Curcuma longa* sobre a resposta antioxidante e anti-inflamatória nos tecidos hepático e renal de camundongos com colite ulcerativa moderada e grave induzida por sulfato de sódio dextrana.

Trabalho Conclusão do Curso foi julgado adequado para obtenção do Título de Licenciada e aprovado, no dia 14/10/2021 em sua forma final pelo curso de Química Licenciatura do Instituto de Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas.



Prof.(a) Dr.(a) Marília Oliveira Fonseca Goulart (Orientadora)
Instituto de Química e Biotecnologia



Dr. Orlando Roberto Pimentel de Araújo (Co-orientador)

Banca Examinadora:

Documento assinado digitalmente

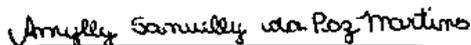
gov.br

Francine Santos de Paula

Data: 14/10/2021 17:00:09-0300

Verifique em <https://verificador.itl.br>

Prof.(a) Dr. (a) Francine Santos de Paula (1º avaliador)
Instituto de Química e Biotecnologia



MSc. Amylly Sanuelly da Paz Martins (2º avaliador)
Doutoranda Renorbio

Este trabalho é dedicado ao meu Senhor, Jesus e Espírito Santo, aos que acreditaram em mim, aos que seguraram minha mão pelos trajetos e à minha família.

AGRADECIMENTOS

Meu maior agradecimento vai para Aquele que mais acredita em mim: Jesus. O Senhor me colocou onde eu sozinha não chegaria e me fez mais forte. O amo cada vez mais.

Agradeço a minha mãe/avó que me apoiou e apoia em tudo o que meu coração faísca em fazer, sou muito abençoada em ter alguém que mesmo não entendendo nada, me apoia em tudo, Margarida, a Sra é incrível demais. À minhas irmãs (Emily, Manu), madrasta e pai (Rejane e Eri) e família como um todo.

Agradeço aos amigos que Jesus me deu como família (Lis, Cinthia, Gisela, Karol), como líderes (Paulo, Vilma, Verinha), sou extremamente grata por acreditarem tanto em mim, por aconselharem e me amarem. Ao Daniel Felipe, por mesmo distante fisicamente, se fazer presente e segurar minha mão, mesmo que não tenha sequer noção.

Aos amigos do lab de eletroquímica e estresse oxidativo (Tauane, Dave, André, Amylly, Gustavo, Jamerson, Anne, Marilene, Rafaela, Samara), co-orientadora (Fabi Moura), coorientador (Orlando) e orientadora (Prof. Marília Goulart) por acreditarem no meu potencial e me proporcionarem a chance de aprender tanto.

Aos amigos que fiz na graduação (Leticia, Maysa, Gabi, Lavinia, Weslany, Jéssica, Iago, Thiago, Pedro, Ricardo), todas as histórias e momentos, valeram a pena.

A todos os professores do Instituto de Química e Biotecnologia e os que contribuíram para minha formação.

Aos órgãos financiadores CNPq e UFAL pelo apoio financeiro.

Se fosse agradecer como meu coração deseja, esta mera folha não seria suficiente. Por isso, me limito a ser direta por motivos de ser sensível demais e cair em lágrimas (de emoção).

Não sei quais caminhos o Senhor me levará, mas confio que é bom, agradável e perfeito. Meu testemunho vai além daqui, e ainda irei contá-la. O Senhor faz muito mais do que sonhamos, e eu sou a prova viva disso.

Esperar em Deus: esta é a verdadeira fé. Sem ordens, sem prazos, sem exigências sobre o que Deus tem de fazer. Basta um coração aberto e mãos abertas prontos para receber o que Deus escolher. Esperar em Deus é uma perfeita confiança de que o que Ele escolhe será melhor do que o nosso melhor.

Elisabeth Elliot

RESUMO

A colite ulcerativa idiopática (CUI), se caracteriza por inflamação difusa da mucosa do cólon, sendo uma doença inflamatória intestinal (DII), cuja etiologia é ainda desconhecida. Os principais agentes etiopatogênicos estudados na CUI, destacam-se a resposta imune e estresse oxidativo. Neste contexto, antioxidantes presentes em alimentos vêm sendo testados afim de reduzir o estresse oxidativo. Dentre eles a *Curcuma longa* tem apresentado diversas propriedades biológicas, tais como antioxidante e anti-inflamatória. Apesar das DII envolverem principalmente o intestino, podem ocasionar manifestações em outros sistemas, as chamadas manifestações extra intestinais (MEI). É objetivo deste trabalho avaliar o efeito do consumo oral do extrato farmacêutico de *Curcuma longa* sobre a resposta antioxidante e anti-inflamatória nos tecidos hepático e renal em camundongos com colite ulcerativa moderada e grave induzidas por sulfato de sódio dextrana (SSD). Foram utilizados 30 camundongos Swiss machos, divididos em 5 grupos: Controle (C), colite moderada (CM), colite grave (CG), grupo com colite Moderada suplementado com extrato *Curcuma longa* (Ext_M) e grupo com colite Grave suplementado com extrato de *Curcuma longa* (Ext_G). Os animais suplementados receberam ração contendo 250 mg/kg/d do extrato de *Curcuma longa* por 30 dias antes da indução da colite, sendo induzida por 7 dias por meio da administração de SSD na água de beber dos animais, nas proporções de 3% e 5%. Durante o período de indução da doença, o uso do extrato foi continuado. No 37º dia, os animais foram, anestesiados, eutanasiados e submetidos à retirada do intestino, fígado e rim para análises histológicas do intestino, determinação da atividade antioxidante (superóxido-dismutase - SOD, catalase - CAT, glutatona reduzida - GSH, glutatona oxidada - GSSG e sua razão - GSH/GSSG), avaliação de estresse oxidativo (peróxido de hidrogênio - H₂O₂, malondialdeído - MDA) perfil inflamatório (mieloperoxidase - MPO). Os níveis teciduais de MDA foram determinados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e para as demais análises por espectrofotometria nos tecidos hepático e renal. Os dados foram analisados por testes paramétricos e não paramétricos, sendo a significância considerada quando $p < 0,05$. A análise histológica confirmou a indução da colite, que foi realizada no grupo suplementado com curcuma. Foi possível observar dano no tecido hepático, grupo moderado e grave suplementado ou não, e tecido renal no grupo de indução grave que foi suplementado com curcuma, causados pela indução da colite, após avaliação de MDA. As análises nos tecidos renal e hepático, mostraram elevação de CAT, na indução em nível moderado e grave, onde a suplementação não teve influência na variação desses níveis. Observou-se uma tendência no aumento de GSH e diminuição de GSSG, com elevação da razão GSH/GSSG no grupo suplementado em ambos os tecidos e níveis de indução, com aumento significativo de MDA no grupo Ex_G do rim, e também observado no C_M e C_G como no grupo Ex_M e Ex_G do fígado. Dessa forma, foi observado dano nos tecidos extra intestinais, não acompanhado de inflamação e a ação da curcumina se estendendo a esses tecidos mas não a diminuir os danos no nível grave da colite no rim e nível moderado da colite no fígado.

Palavras-chave: Manifestações extra intestinais. Planta medicinal. Doença gastrointestinal.

ABSTRACT

Idiopathic ulcerative colitis (CUI) is characterized by diffuse inflammation of the colonic mucosa, being an inflammatory bowel disease (IBD) which etiology is still unknown. The main etiopathogenic agents studied in CUI are the immune response and oxidative stress, which stand out. In this context, antioxidants present in food have been tested in order to reduce oxidative stress. Among them, *Curcuma longa* has shown several biological properties, such as antioxidant and anti-inflammatory. Although IBD mainly involve the intestine, they can cause manifestations in other systems, the so-called extra intestinal manifestations (MEI). The aim of this work is to evaluate the effect of oral consumption of the pharmaceutical extract of *Curcuma longa* on the antioxidant and anti-inflammatory response in liver and kidney tissues in mice with moderate and severe ulcerative colitis induced by dextran sodium sulfate (DSS). Thirty male Swiss mice were used, divided into 5 groups: Control (C), Moderate colitis (CM), Severe colitis (CG), group with Moderate colitis supplemented with *Curcuma longa* extract (Ext_M) and group with Severe colitis supplemented with extract from *Curcuma longa* (Ext_G). The supplemented animals received a diet containing 250 mg/kg/d of *Curcuma longa* extract for 30 days before colitis induction, being induced for 7 days through the administration of SSD in the animals' drinking water, in proportions of 3% and 5 %, for 7 days. During the period of disease induction, use of the extract was continued. On the 37th day, the animals were anesthetized and submitted to removal of the intestine, liver and kidney for histological analysis of the intestine, determination of antioxidant activity (superoxidodismutase - SOD, catalase - CAT, reduced glutathione - GSH, oxidized glutathione - GSSG and its ratio - GSH/GSSG), oxidative stress evaluation (hydrogen peroxide - H₂O₂, malondialdehyde - MDA) inflammatory profile (myeloperoxidase - MPO). Tissue levels of MDA were determined by high performance liquid chromatography (HPLC) and for other analyzes by spectrophotometry in liver and kidney tissues. Data were analyzed using parametric and non-parametric tests, with significance considered when $p < 0.05$. Histological analysis confirmed the induction of colitis, which was performed in the group supplemented with turmeric. It was possible to observe damage in liver tissue, moderate and severe group supplemented to no and renal tissue in the severe induction group that was supplemented with curcuma, caused by colitis induction, through MDA analyses. The analyzes in the renal and hepatic tissue showed an increase in CAT, in the induction of moderate and severe levels, where supplementation had no influence on the variation of these levels, there was a trend towards an increase in GSH and a decrease in GSSG, with an increase in the GSH/GSSG ration in the supplemented group at both tissue and induction levels, significant increase in MDA in the Ex_G kidney group, and also seen in the Ex_M liver. Thus, damage to extra intestinal tissues was observed, not accompanied by inflammation and the action of curcumin extending to these tissues but not to decrease the damage to the severe level of colitis in the kidney and moderate level of colitis in the liver.

Keywords: Extra intestinal manifestations. Medicinal plant. Gastrointestinal disease.

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Resultados dos marcadores analisados referentes aos grupos suplementados com extrato farmacêutico de <i>Curcuma longa</i> no tecido renal e hepático de camundongos com colite ulcerativa nos níveis moderado e grave de indução por SSD.....	46
---	----

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- (A) <i>Curcuma longa</i> (B) Rizoma da <i>Curcuma longa</i> ; (C) Rizoma em pó.....	19
Figura 2 - Estrutura da Curcumina	19
Figura 3 - Propostas da ação antioxidante da curcumina	20
Figura 4 - Atividades biológicas da curcumina	21
Figura 5 - Esquema ilustrativo de alvos das espécies reativas de oxigênio e nitrogênio.	24
Figura 6 - Esquema do processo experimental dos animais com colite ulcerativa moderada e grave induzidos por SSD (3 e 5%), sendo Ex_M= grupo com colite moderada suplementado com extrato farmacêutico de <i>Curcuma longa</i> e Ex_G= grupo com colite grave suplementado com extrato farmacêutico de <i>Curcuma longa</i>	30
Figura 7 - Aspectos histológicos do cólon de camundongos com colite ulcerativa induzida por sulfato de sódio dextrana: (teste de hematoxilina eosina (HE) nível moderado de colite – Controle (A); Controle ‘ (B); Extrato Moderado (C). Aumento de 20 x.....	38
Figura 8 - Aspectos histológicos do cólon de camundongos com colite ulcerativa induzida por sulfato de sódio dextrana: (teste de hematoxilina eosina (HE) nível grave de colite – Controle (A); Controle Grave (B); Extrato Grave (C). Aumento de 20 x.....	39
Figura 9 - Níveis de MPO, SOD, H ₂ O ₂ , SOD, CAT, GSH, GSSG, razão GSH/GSSG e MDA referentes ao tecido renal de animais dos grupos Controle (C), Controle Moderado (C_M), grupo com colite moderada suplementado com Extrato de <i>Curcuma longa</i> (Ex_M) induzidos por SSD 3%	40
Figura 10 - Níveis de MPO, SOD, H ₂ O ₂ , SOD, CAT, GSH, GSSG, razão GSH/GSSG e MDA referentes ao tecido renal de animais dos grupos Controle (C), Controle Grave (C_G), grupo com colite grave suplementado com Extrato de <i>Curcuma longa</i> (Ex_G) induzidos por SSD 5%.....	41
Figura 11 - Níveis de MPO, SOD, H ₂ O ₂ , SOD, CAT, GSH, GSSG, razão GSH/GSSG e MDA referentes ao tecido hepático de animais dos grupos Controle (C), Controle Moderado (C_M), grupo com colite moderada suplementado com Extrato de <i>Curcuma longa</i> (Ex_M) induzidos por SSD 3%.....	43
Figura 12 - Níveis de MPO, SOD, H ₂ O ₂ , SOD, CAT, GSH, GSSG, razão GSH/GSSG e MDA referentes ao tecido hepático de animais dos grupos Controle (C), Controle Grave (C_G), grupo com colite grave suplementado com Extrato de <i>Curcuma longa</i> (Ex_G) induzidos por SSD 5%.....	45

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABS - Absorvância
BHT- Di-*terc*-butil-hidroxitolueno
BHTA - Brometo de Hexadeciltrimetilamônio
CAT – Catalase
CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CUI – Colite Ulcerativa Idiopática
DC – Doença de Crohn
DII – Doença Inflamatória Intestinal
DTNB – Ácido 5,5-bis-ditionitro-2-nitrobenzóico
EROs – Espécies Reativas de Oxigênio
ERONs – Espécies Reativas de Oxigênio e Nitrogênio
ERNs – Espécies Reativas de Nitrogênio
FANUT- Faculdade de Nutrição
GPx – Glutaciona Peroxidase
GSH – Glutaciona Reduzida
GSSG – Glutaciona Oxidada
GR – Glutaciona Redutase
HE - Hematoxilina e Eosina
MDA - Malondialdeído
MEI – Manifestações Extra Intestinais
MPO - Mieloperoxidase
NADPH – Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato Reduzido
NEM - N-etilmaleimida
PBS – Tampão Fosfato
pH – potencial Hidrogeniônico
PR – Peroxidase de Rabanete
RIPA- Tampão de ensaio de radioimunoprecipitação
SOD – Superóxido Dismutase
SSD – Sulfato de Sódio Dextrana
TMP – 1,1,3,3-Tetrametoxopropano
UV-Vis – Ultravioleta Visível

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	15
2	REVISÃO BIBLIOGRAFICA	17
2.1	Plantas Medicinais	17
2.2	<i>Curcuma longa</i>	18
2.3	Doença Inflamatória Intestinal.....	22
2.4	Espécies Reativas de Oxigênio e Nitrogênio (ERONs)	23
2.5	Manifestações Extra Intestinais.....	25
2.6	Tratamento Convencional e Alternativas Terapêuticas.....	26
3	OBJETIVOS	28
3.1	Objetivo Geral.....	28
3.2	Objetivos Específicos	28
4	METODOLOGIA.....	28
4.1	Materiais e Métodos	28
4.1.1	Reagentes	28
4.1.2	Equipamentos:	29
4.2	Delineamento Da Fase Experimental.....	29
4.3	Análises	31
4.4.1	Análises Histológicas:	31
4.4.2	Análise de Marcadores da Capacidade Antioxidante	31
4.4.2.1	Determinação de Superóxido Dismutase (SOD)	31
4.4.2.2	Determinação de Catalase (CAT):	32
4.4.2.3	Determinação dos níveis de glutathiona reduzida (GSH) e oxidada (GSSG): .	32
4.3.3	Análise de marcadores de estresse oxidativo.....	33
4.4.3.1	Determinação de Peróxido de Hidrogênio (H ₂ O ₂):	33
4.4.3.2	Determinação dos níveis de malondialdeído (MDA):	34

4.3.5	Análise de marcador inflamatório.	34
4.4.5.1	Determinação de Mieloperoxidase (MPO):.....	35
4.4	Análise Estatística.....	35
4.5	Aspectos Éticos.....	36
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	37
5	CONCLUSÃO.....	48
6	PERSPECTIVAS.....	49
	REFERÊNCIAS.....	50

1 INTRODUÇÃO

As plantas medicinais consistem numa forma econômica para tratamento de diversas doenças, no cuidado com a saúde e amplamente empregadas, principalmente nos países em desenvolvimento. Estudos com as mais diversas plantas medicinais vem sendo avaliadas afim de que sejam obtidos cada vez mais benefícios e ampliação de suas utilizações.

A curcumina, pigmento amarelo, é um dos 3 curcuminóides encontrados no açafrão, extraída dos rizomas da *Curcuma longa*, e apresenta maior atividade biológica entre eles. É utilizada na culinária, como tempero, corante alimentar e como medicamento natural. A curcumina possui diversas propriedades, entre elas, anti inflamatória, antioxidante, antidepressiva, antidiabética, antimicrobiana e outros (MENON; SUDHEER, 2007; KUNNUMAKKARA et al, 2016).

Dentre as doenças inflamatórias intestinais (DII), estão, predominantemente, a colite ulcerativa idiopática (CUI) e a doença de Crohn (DC), sendo essas causadas por inflamação crônica do trato gastrointestinal de etiologia ainda desconhecida. No entanto, é possível associar diversos fatores que desempenham papéis importantes, como a resposta imune, a microbiota gastrointestinal, a suscetibilidade genética e fatores ambientais (ROBERT-THOMPSON, 2019).

A CUI afeta especificamente colón e reto, já a DC pode atingir qualquer parte do trato gastrointestinal e em ambas, há a suscetibilidade de manifestações extra intestinais (MEI), que incluem diversas complicações na vida de portadores de uma destas doenças. Ambas afetam tanto homens quanto mulheres e a faixa etária não é bem definida, acometendo pessoas numa variação entre 15 a 80 anos, tanto em países desenvolvidos como em desenvolvimento (CAMBUI; NATALI, 2015).

Por ser uma doença crônica, os tratamentos da CUI consistem no alívio dos sintomas, prevenção de reincidência e a indução da remissão, e para isso se faz necessário o uso de medicamentos farmacológicos (KAYAL; SHAH, 2020). O uso dos medicamentos utilizados nos tratamentos convencionais traz consigo efeitos colaterais, distúrbios gastrointestinais como mal estar, cefaleia, leucopenia que é a diminuição da taxa de leucócitos no sangue abaixo do normal, abre possibilidade para infecções, distúrbios e outros (CAMBUI; NATALI, 2015).

A busca por alternativas terapêuticas tem aumentado cada vez mais, e o uso de plantas medicinais tem sido uma delas, uma vez que o emprego das mesmas vem sendo feita a tempo considerável em diversas culturas, além de apresentar uma forma econômica de tratamento. As pesquisas de novos fármacos advindos de plantas medicinais, vem sendo mais acentuadas para fins terapêuticos e preventivos, de maneira a comprovar sua eficácia, bem como a identificação de seus princípios ativos e de suas propriedades farmacológicas, o que também pode promover a possibilidade de potencialização dos mesmos. Para a CUI, os mais visados são possíveis fármacos que apresentem propriedades anti inflamatórias e antioxidantes.

Visando então, a possibilidade de utilização da *Curcuma longa*, como alternativa terapêutica, para a CUI, foram realizadas análises experimentais afim de avaliar a ação terapêutica da *Curcuma longa* frente às manifestações extra intestinais decorrentes da CUI em importantes tecidos como hepático e renal de camundongos com colite ulcerativa moderada e grave induzida por sulfato de sódio dextrana (SSD).

2 REVISÃO BIBLIOGRAFICA

2.1 Plantas Medicinais

As plantas possuem um vasto campo para possibilidades de uso, e um deles está no uso medicinal. As práticas de utilização, em diversas culturas, são milenares, sendo passadas por gerações, e mesmo sem comprovação científica já se sabia de seus benefícios no tratamento de diversas doenças e no condicionamento para uma melhor qualidade de vida, do cuidado com a saúde. Cerca de 80% da população nos países em desenvolvimento fazem uso de produtos naturais, em virtude de sua eficácia, por apresentarem baixo nível tóxico, e por sua ação terapêutica requerer doses abaixo de seus níveis de toxicidade (FADUS et al, 2017). No entanto, seu uso não deve ser de forma indiscriminada, e por isso, há vários estudos, afim de assegurar a eficácia e a dosagem segura, bem como a comprovação real das atividades farmacológicas (ARGENTA et al, 2011; PEDROSO; ANDRADE; PIRES, 2021).

Uma vez que se tem o produto natural, a abordagem utilizada se relaciona ao isolamento e purificação de moléculas aí presentes. São realizadas análises fitoquímicas, são escolhidas partes da planta, como raízes, caules, cascas, folhas, frutos, galhos e flores. A seguir, são investigadas as suas possíveis ações biológicas e farmacológicas, na perspectiva terapêutica e preparadas novas formulações de fármacos, para melhorar a biodisponibilidade. De uma forma geral, o uso de produtos feitos com base de produtos naturais, de uso longo, são seguros, uma vez que utilizados de forma correta sem que haja o surgimento de efeitos colaterais e se conhecendo para qual finalidade, ele está sendo usado (PEDROSO; ANDRADE; PIRES, 2021). Muitas vezes o uso integral ou enriquecido do extrato pode ser mais eficiente que as substâncias isoladas. Porém, muitos produtos naturais são tóxicos e não devem, de forma alguma, ser usado indiscriminadamente.

Alguns fatores são levados em conta, em relação ao estudo de plantas medicinais, como a origem do produto, se é encontrado em uma ou mais regiões, uma vez que se torna relevante a avaliação de modificações químicas que possam ocorrer por causa de variações ambientais (fertilidade e constituição química do solo, presença de metais, umidade, vento, temperatura, poluição atmosférica e do solo, época e local de colheita por exemplo). A identificação, os cuidados com preparo, a conservação e o armazenamento são fatores relevantes e todas as etapas bem como o controle de qualidade são levados em conta, uma vez

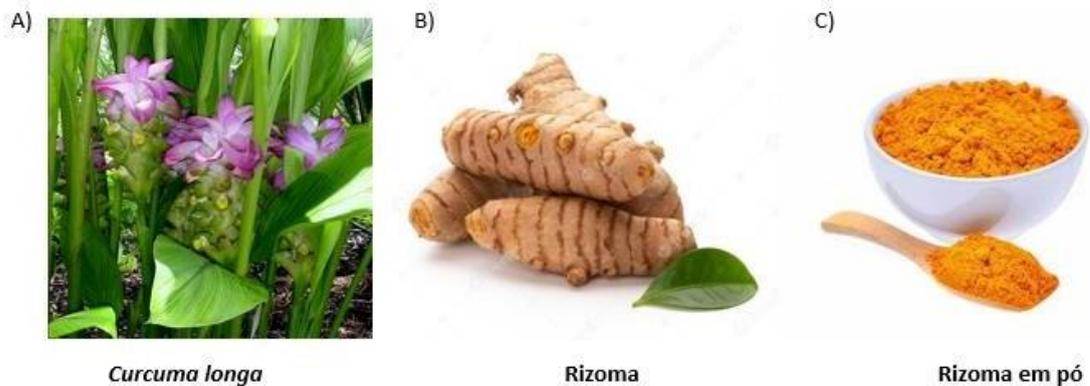
que uma conservação inadequada pode acarretar em contaminação por microorganismos, com seus produtos, como toxinas fúngicas (micotoxinas), que podem provocar reações hepáticas e renais indesejáveis, uma vez que são metabólitos secundários de fungos que apresentam toxicidade, dependendo da concentração. Os efeitos tóxicos podem ser apresentados como decorrência do uso em quantidade excessiva ou em tempo prolongado (o uso geralmente tem tempo limitado dependendo do objetivo ao qual está sendo empregado), ou ainda por ser característica da própria planta possuir constituintes tóxicos. Os efeitos adversos podem variar e os mais recorrentes devem sempre ser levados em consideração, bem como alertados, podendo se apresentar desde náusea, irritação na pele, vômitos como também levar a estresse oxidativo, perda de consciência, alucinações e até à morte, entre outros (MACIEL e al, 2002; PEDROSO; ANDRADE; PIRES, 2021).

2.2 *Curcuma longa*

A fitoterapia é uma estratégia universal na terapia. Dentre as mais diversas plantas, usadas e estudadas, a *Curcuma longa* se destaca, devido aos seus constituintes químicos.

Curcuma longa pertencente à classe *Liliopsida* e à família *Zingiberaceae*, é encontrada em regiões tropicais e subtropicais, visto que requer um clima quente (entre 20-30°C) e úmido, e embora a Índia seja seu maior produtor e consumidor, hoje é amplamente utilizada em várias regiões, sendo no Brasil popularmente conhecida com açafrão da terra. Os estudos encontrados se referem a várias partes da planta, sendo elas: folhas, flores e o rizoma, porém a parte mais utilizada é o rizoma, que é empregado como tempero, corante e agente importante na medicina em países do sul da Ásia e do Oriente Médio, usado para tratar infecções oculares, cicatrização de feridas, tratar mordidas e queimaduras, doenças de pele, doenças dentárias, distúrbios digestivos e muitas outras doenças. Na medicina hindu, se fazia o uso da curcuma para torções e inchaços; já na medicina chinesa seu uso está associado principalmente ao tratamento de dores abdominais (CAMATARI, 2017; GRUPT et al, 2017).

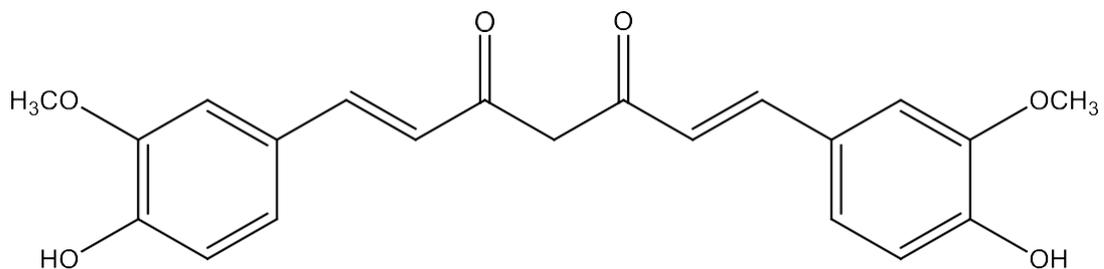
Figura 1- (A) *Curcuma longa* (B) Rizoma da *Curcuma longa*; (C) Rizoma em pó.



Fonte: (A) siampictures.com, (B) freepik.com, (C) herbal-plantextract.com.

A *Curcuma longa* possui diversos constituintes, porém 3 se encontram em maiores proporções, sendo eles curcuminoides, aproximadamente 70% de curcumina (Fig. 2), o mais bioativo dentre eles, 17% de desmetoxicurcumina e 3% de bisdesmetoxicurcumina, o que apresenta menor ou nenhuma bioatividade.

Figura 2 - Estrutura da Curcumina.



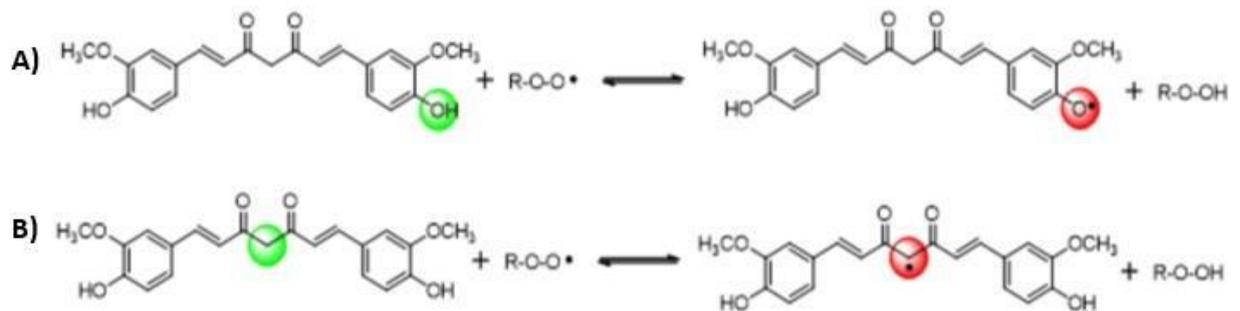
Fonte: GUPTA, 2012.

A curcumina foi isolada pela primeira vez no ano de 1815, por Vogel, mas só em 1910 teve sua fórmula identificada como 1,7-bis(4-hidroxi-3-metoxi-fenil)-1,6-heptadieno-3,5-diona, por Milobedzka e Lampe, sendo um pó cristalino de coloração laranja-amarelo e apresenta baixa solubilidade em água. Quimicamente, a curcumina apresenta 3 grupos funcionais, sendo eles: um grupo β -cetona, dois grupos fenólicos e duas ligações duplas

conjugadas com a carbonila e com o anel aromático (SUETH-SNTIAGO et al, 2015; CAMATARI, 2017).

Devido à natureza estrutural da curcumina, possuindo os grupos fenólicos e grupos conjugados, os estudos tem-se voltado para sua ação antioxidante, podendo a atividade ser relacionada ao grupo metileno α às carbonilas e as hidroxilas fenólicas, por doação de hidrogênio radicalar, que irá reagir com as espécies reativas de oxigênio (EROs) e então neutralizar essas moléculas, preservando as células de danos oxidativos (Fig.3). A estabilidade da curcumina se daria devido a ressonância do radical gerado, o que pode justificar sua ação antioxidante. Outra proposta coloca em preferência o grupo metileno como doador de hidrogênio, devido a ligação C-H ser mais fraca por estar em alfa às duas carbonilas e a forma dicetônica fica mais presente em ambiente de pH ácido, que é o caso de tecidos em processo de inflamação (SUETH-SNTIAGO et al, 2015).

Figura 3 - Propostas da ação antioxidante da curcumina.



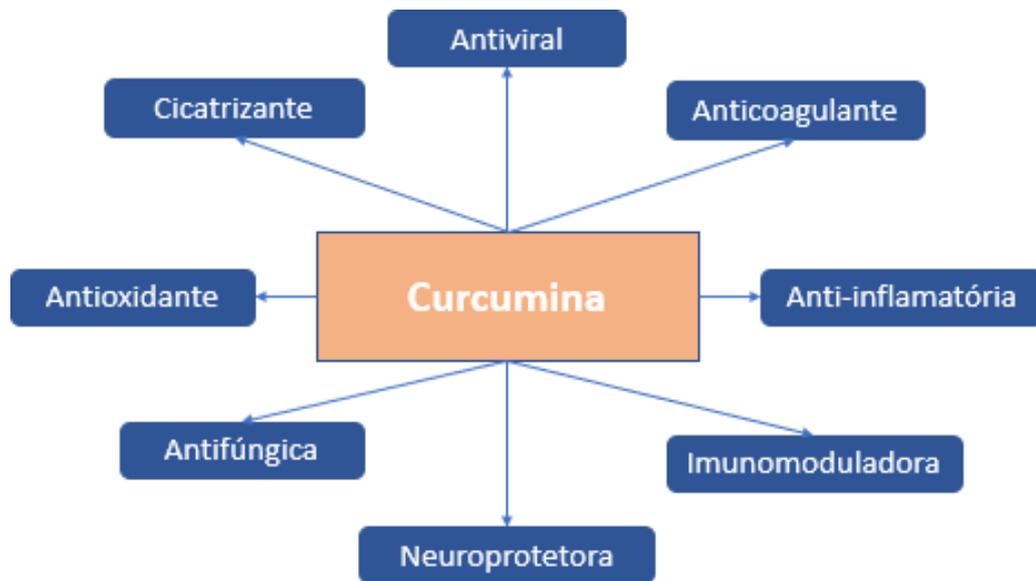
Legenda: A) mecanismo de reação da atividade antioxidante por doação de hidrogênio radicalar da hidroxila fenólica. B) mecanismo de reação da atividade por doação de hidrogênio radicalar do metileno α às carbonilas.

Fonte: SUETH-SNTIAGO et al, 2015.

Diversos estudos com a curcumina, mostraram várias aplicações devido suas propriedades biológicas (Fig. 4), podendo agir com diversos alvos moleculares dentro da célula, sendo mais visadas as ações antioxidante, anti-inflamatória e antitumoral, tendo a capacidade de reduzir o estresse oxidativo, e assim possuir vários mecanismos de ação. Sendo um inibidor da via NF- κ B, ativados por estímulos extracelulares que dependem da presença de EROs decorrentes de lesões, processos inflamatórios e estresse oxidativo, devido às

hidroxilas fenólicas e à função 1,3-dicetônica, se faz possível a captura dessas espécies e impossibilita ou minimiza a ativação da via. Alterações nos mecanismos apoptóticos que levam ao surgimento de várias doenças, incluindo câncer, doenças autoimunes ou degenerativas, também podem ser moduladas pela curcumina. A possibilidade do desenvolvimento de fármacos que podem ser utilizados em tratamentos e prevenções em diversas doenças se mostram muito promissoras e até seus metabólitos apresentam ações biológicas importantes (SUETH-SNTIAGO et al, 2015).

Figura 4 - Atividades biológicas da curcumina.



Fonte: adaptado de SUETH-SNTIAGO et al, 2015.

A curcumina apresenta baixa solubilidade em meio aquoso e baixa biodisponibilidade, o que faz com que seja pouco absorvida, de rápido metabolismo e eliminação sistêmica, o que vem sendo um dos desafios a serem contornados e várias abordagens são estudadas, como o uso da curcumina em nanopartículas, complexos fosfolipídicos de curcumina, reformulação com óleos e inibidores do metabolismo. Porém mesmo apresentando uma baixa absorção, a curcumina se mostra como uma molécula que rapidamente permeia membrana celulares, sendo assim importante a nível celular (SUETH-SNTIAGO et al, 2015; KUNNUMAKKARA et al, 2016).

2.3 Doença Inflamatória Intestinal

As doenças inflamatórias intestinais (DII) consistem em um grupo de doenças que acometem o trato gastrointestinal, são de caráter inflamatório crônico, autoimune e não curáveis, apresentando alternância entre períodos de recorrência e alívio, bem como variação de graus de severidade da doença. Seus sintomas característicos são dores abdominais, diarreia crônica, perda de peso, sangramento retal, distensão ou fistulização na parede abdominal. Visto que a mucosa gastrointestinal é exposta a diversos microrganismos, quando alguma espécie patogênica é detectada, o sistema imunológico inicia a resposta imune, que reconhece o patógeno e sinaliza para que haja proteção. Quando há atividade anormal ou desequilíbrio do sistema imunológico o que ocorre é uma resposta inflamatória e nas DII, a mucosa ativa fatores de inflamação que fazem com que haja indução à morte celular por apoptose. (HUANG; CHEN, 2016).

A descoberta das DII se deu por volta do final do século XIX e início do século XX, e seus estudos só a partir de 1950. Os estudos iniciais proporcionaram a construção gradual de informações, sendo eles tanto de observações quanto de ensaios experimentais com modelos animais (STROBER et al, 1998).

As DII podem acometer pessoas numa ampla faixa etária, que vai dos 15 aos 80, tendo casos abaixo e acima, podendo ela ser delimitada como primeira ocorrência, entre 15 e 25 anos, e segunda, entre 50 e 80 anos. Ambas têm atingindo cerca de 1,4 milhão de pessoas na América do Norte, e cerca de 2,2 milhão na Europa, sendo os Estados Unidos, Inglaterra, Itália e os países da região norte os que mostram ter mais incidência de casos, No entanto, mesmo sendo de baixa prevalência, tem-se observado um aumento de casos em países como Japão, Coreia do Sul, Norte da Índia e América Latina (FERRAZ, 2016; BRITO et al, 2020).

Na América do Sul, as DII eram consideradas raras, no entanto, no Brasil, o número de casos tem aumentado, nas regiões Sul e Sudeste do país, e se torna menos comum comparado com outras doenças. Num período de 10 anos (2009-2019), foram registradas cerca de 46.546 internações, e tendo um aumento no ano de 2018, correspondendo a 10,57% dos casos e a prevalência de casos de internação se encontrou na faixa de 30 a 39 anos, sendo 53,55% mulheres e 46,44% homens (FERRAZ, 2016; BRITO et al, 2020).

A etiologia da colite é desconhecida, mas teorias, tentam explicar os fenômenos que podem levar a inflamação da mucosa causadas pela doença, como a teoria da indução radical

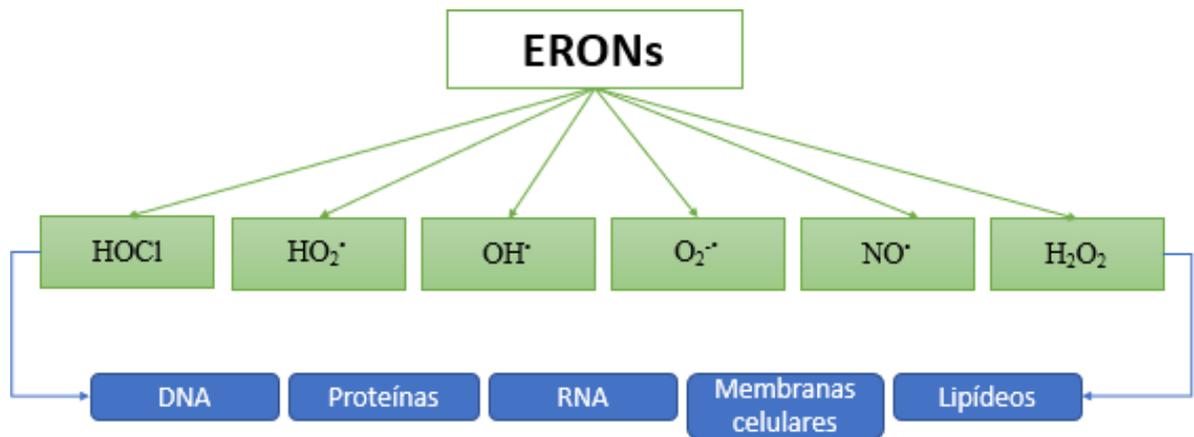
arque propõe o dano inicial do estresse oxidativo nas células, uma vez que as espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, que são danosas às células, causam desequilíbrio e uma quebra nas defesas que formam a barreira da mucosa, permitindo assim que bactérias possam migrar do lúmen do colón para a submucosa estéril, e na tentativa de combater, células neutrófilas, principalmente, migram para a parede do intestino, levando à inflamação característica (MARTINEZ; RIBEIRO; GAMBERO et al, 2010; PRIOR, 2015).

Fatores endógenos ou exógenos podem iniciar a modulação da resposta imune e a sinalização inflamatória é ativada através de macrófagos, linfócitos e neutrófilos que acabam resultando em danos teciduais. Estudos apontam níveis de citocinas pró inflamatórias elevadas como TNF- α , em concentrações elevadas no sangue, mucosa e fezes de portadores de DII (BRITO et al, 2020).

2.4 Espécies Reativas de Oxigênio e Nitrogênio (ERONs)

As espécies reativas de oxigênio e nitrogênio desempenham papéis no organismo e são naturalmente produzidas pelo próprio metabolismo dos seres vivos, e nada mais são que átomos ou moléculas com elétrons desemparelhados nos seus orbitais mais externos, o que permite a transferência de elétrons com moléculas vizinhas, agindo como doador ou receptor dos mesmos, sendo muito reativos. Quando em excesso no meio, fazem com que haja uma desordem ou alteração no ambiente molecular. Algumas das espécies reativas de oxigênio (EROs) e nitrogênio (ERN's) são: radical ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), radical hidroxila (OH^{\cdot}), hidroperóxido (HO_2^{\cdot}), óxido nítrico (NO^{\cdot}), sendo o radical hidroxila o mais reativo e mais danoso as células. O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o ácido hipocloroso ($HOCl$) embora não sejam tão instáveis como as espécies radicalares, tem a capacidade de reagir com moléculas, o peróxido, por exemplo, consegue atravessar a membrana nuclear e se converter no radical hidroxila, sendo um produto causador de danos. O estresse oxidativo surge do excesso de espécies reativas e a deficiência de espécies antioxidantes para combatê-las, ou seja, gera um desequilíbrio redox (SHAMI; MOREIRA, 2004; PRAVDA, 2005; MARTELLI; NUNES, 2014).

Figura 5 - Esquema ilustrativo de alvos das espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (ERONs).



Legenda: $O_2^{\cdot-}$ = ânion superóxido; OH^{\cdot} = radical hidroxila; HO_2^{\cdot} = hidroperóxido; NO^{\cdot} = óxido nítrico; H_2O_2 = peróxido de hidrogênio; $HOCl$ = ácido hipocloroso.

Fonte: adaptado de Palma, 2013.

O radical hidroxila é o mais danoso dentre os EROs, devido seu tempo de meia vida ser curto e por atacar moléculas por abstração de hidrogênio e adição a insaturações e apenas duas estratégias são possíveis para controlar sua presença: reparando os danos causados ou inibindo sua formação, sendo a inibição o mais desejado. Sua formação se origina por dois possíveis mecanismos, um pela reação do H_2O_2 na presença de metais e homólise da água devido exposição à radiação ionizante. No corpo, os metais de transição importantes para que a reação ocorra são Fe^{2+} (reação de Fenton) e Cu^{1+} , sendo o ferro mais propício a reações por ter maior biodisponibilidade e se encontrar complexado em proteínas de transporte ou armazenamento. No DNA, ataca bases nitrogenadas e a desoxirribose, já nos açúcares ataca abstraindo átomos de hidrogênio e seu ataque mais comum a lipídios é aos de membrana, onde os radicais atacam sítios susceptíveis convertendo um novo centro radicalar, e esse carbono radicalar irá adicionar oxigênio e gerar um radical lipídico-peroxila, que pode atacar proteínas de membrana e produzir danos as células (BARREIROS; DAVID, 2006).

2.5 Manifestações Extra Intestinais

Nas DII, embora a CUI acometa de forma predominante o intestino, outros órgãos podem sofrer em decorrência da mesma. Essas ocorrências são chamadas de manifestações extra intestinais, uma vez que o organismo está fragilizado e susceptível, e a prevalência da mesma pode variar de 6 a 46% (CORICA; ROMANO, 2015). Cerca de 10% dos pacientes diagnosticados com DII apresentam quadro clínico com manifestações extra intestinais (MEI) e 25% dos pacientes com DII mostram desenvolver em determinado momento de sua vida, sendo elas relacionadas a manifestações musculoesqueléticas, hepatobiliar, oftálmicas, vasculares e sanguíneas, neurológicas, cardíacas, pancreáticas, pulmonares, autoimunes e renais, podendo ser assintomáticos ou não. Em quadros clínicos mais graves, pode-se notar leucocitose, aumento dos níveis séricos de proteína C reativa. (LOPETUSO; GASBARRINI, 2016; BRITO et al, 2020).

As manifestações hepáticas associadas em estudos são: infiltração gordurosa, pericolangite, cirrose, hepatite crônica ativa, colangite, colelitíase, trombose de veia porta e de veias hepáticas, sendo a colangite esclerosante a mais comum, tendo o envolvimento do estresse oxidativo e da inflamação como sendo os causadores das lesões hepatobiliares em decorrência da CUI (MOTA; KISS et al, 2007).

Já as manifestações renais mais frequentes são: nefrite, nefrite tubulointersticial, glomerulonefrite e amiloidose, tendo mais frequência a nefrolitíase, atingindo cerca de 12 a 28% dos pacientes. Estudos apontam para a atividade inflamatória da CUI e a permeabilidade da barreira intestinal que ocasiona uma resposta inflamatória local, essa podendo apresentar melhora após intervenções cirúrgicas (CORICA; ROMANO, 2015).

Tanto as doenças hepáticas quanto as renais podem ser decorrentes da DII diretamente, antes ou após o andamento clínico, ou tendo envolvimento com outra doença devido ao mecanismo de ação autoimune e também podem ser associados a possíveis efeitos colaterais de fármacos. (CORICA; ROMANO, 2015; SILVA; BRITO et al, 2019)

Os mecanismos fisiopatológicos não são bem definidos, e muito se tem ainda para descobrir sobre as MEI, mas sabe-se que as DII desempenham papel importante no surgimento delas.

2.6 Tratamento Convencional e Alternativas Terapêuticas

Antes do tratamento, inicialmente ocorre o diagnóstico, onde se faz um mapeamento da condição do paciente e o estágio em que se encontra. Por serem doenças crônicas, a possibilidade que se busca é de remissão da doença, prolongar essas remissões e diminuir o número de recaídas, o que trará melhor qualidade de vida possível ao paciente. O tratamento inicial envolve dieta e, mediante o quadro clínico ou o avanço dele, o uso de medicamentos se faz necessário, podendo ser: anti-inflamatórios (geral ou seletivo), imunossuppressores, antibióticos, corticoides e, quando o quadro clínico se agrava, se faz necessária também intervenções cirúrgicas, sejam elas ressecções ou enteroplastias. É necessário analisar a localização da doença, a intensidade, a resposta à terapia medicamentosa e o diagnóstico de complicações (BIONDO-SIMÕES et al, 2003; BRITO et al, 2020).

O tratamento, tido como de primeira linha, é feito com 5-aminossalicilatos (5-ASA), para indução da remissão e manutenção, em casos leves e moderados. Seu uso se faz por via oral, e retal, e quando em casos graves o uso de corticoides se faz necessário. Para os pacientes resistentes a corticoides, se faz o uso de drogas imunomoduladoras como tiopurinas e metotrexato. Nos pacientes que são resistentes em ambas, tratamentos biológicos são aplicados (BARROS, 2020). Tratamentos com a tofacitnibe, inibidor oral de pequena molécula Janus quinase, vedolizumabe, anticorpo monoclonal e adalimumabe, também um anticorpo monoclonal, são estudados na indução da remissão e manutenção da doença podendo ser um caminho para tratamento a longo prazo sem a utilização de esteroides ou imunossuppressores. Tem-se em mente que devido ao uso prolongado desses fármacos, há diversos efeitos adversos e seus efeitos benéficos são limitados, o que leva muitos pacientes a intervenções cirúrgicas em algum ou vários momentos da vida (SANDBORN et al, 2012; LOFTU et al, 2017; SANDBORN et al, 2017).

Tem-se como opção terapêutica biológica, o uso do infliximab, anticorpo monoclonal que neutraliza a atividade TNF- α , explorado para o tratamento da CUI, porém não se tem a exclusão de contraindicações, frente a doenças que possam ser agravadas por seu uso (MOSS; FARREL, 2016; BARROS, 2021).

Os efeitos protetores da curcumina sobre o tecido renal vem sendo ligado à diminuição da regulação de citocinas profibróticas, fator de crescimento endotelial vascular,

fator de crescimento do tecido conjuntivo e proteínas de matriz extra celular como fibronectina, tem mostrado capacidade de redução da progressão dos danos renais e redução da resposta inflamatória renal pela diminuição da infiltração de macrófago renal e de citocinas pró inflamatórias como TNF- α , bem como regular enzimas e proteínas citoprotetoras e antioxidantes como SOD, CAT, glutathione S-transferase (RAPA et al, 2020).

Sendo o uso de plantas medicinais uma forma econômica e tendo a curcumina, frente aos inúmeros benefícios fornecidos, sua utilização em doenças inflamatórias intestinais como a CUI, se mostram como uma opção muito desejada e promissora, inibindo EROs e protegendo assim o organismo de danos. O trabalho em questão realizou análises referentes a atividade antioxidante, anti inflamatória em camundongos com CUI, suplementados com extrato de *Curcuma longa* em tecidos hepático e renal, afim de verificar a eficiência da curcumina frente a manifestações extra intestinais da CUI.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

- Avaliar ação do extrato de *Curcuma longa* sobre a resposta redox e inflamatória, nos tecidos hepático e renal em animais com colite ulcerativa.

3.2 Objetivos Específicos

- Identificar histologicamente danos no cólon dos animais que tiveram a colite induzida.
- Avaliar o efeito do extrato farmacêutico de *Curcuma longa* sobre o perfil redox nos tecidos hepático e renal de camundongos com colite induzidos por SSD.
- Avaliar as mudanças no perfil inflamatório nos tecidos hepático e renal de animais induzidos a colite moderado e grave, suplementados com extrato farmacêutico de *Curcuma longa*.

4 METODOLOGIA

4.1 Materiais e Métodos

4.1.1 Reagentes:

Acetonitrila; Ácido clorídrico (HCl); Ácido Etilenodiamino Tetra-acético (EDTA); Ácido metafosfórico (MPA); Albumina bovina sérica (BSA); Extrato farmacêutico (Ext), obtido em abril de 2015, da Fagron Brasil; Eosina; Etanol (C₂H₆O); Fosfato de sódio monobásico (NaH₂PO₄); Fosfato de sódio dibásico (Na₂HPO₄); Glutathione redutase (GR); Hematoxilina; Hidróxido de sódio (NaOH); Inibidor de protease (IP); Metanol; Nicotinamida dinucleotídeo fosfato (NADPH); Peroxidase de Rabanete; Peróxido de hidrogênio (H₂O₂); Sódio dodecil sulfato (SDS); Tampão RIPA (10X), obtido da Cell Signaling®; Tampão fosfato monobásico; Tampão fosfato dibásico; Vermelho de Fenol;

5,5 ditobis (ácido 2-nitro benzoico) (DTNB); 1,1,3,3 Tetrametoxipropano (TMP); 2,4-dinitrofenilidrazina (DNPH).

4.1.2 Equipamentos:

Agitador magnético AP 55, Phoenix; Balança Analítica; Biofreezer VIP Serie Sanyo; centrífuga refrigerada; Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) acoplado à detecção UV-Vis (Shimatzu, Serial no. L201550); Espectrofotômetro UV/vis Thermo Scientific; Microscópio óptico (Nikon 600N) acoplado a uma máquina digital Nikon 4500, UO126; Pipeta Multicanal 200 µL; Vórtex.

4.2 Delineamento Da Fase Experimental

O delineamento experimental teve duração de 37 dias. Os animais foram provenientes do Biotério central da UFAL e acomodados em gaiolas, contendo água e ração, sendo randomizados e separados por grupos, no Biotério da Faculdade de Nutrição (FANUT) numa temperatura de $24 \pm 1^\circ\text{C}$, em um ciclo claro/escuro de 12h. Os animais receberam água a livre demanda e ração.

A *Curcuma longa* utilizada foi na forma de extrato, sendo 250mg.kg.d^{-1} . Foram utilizados 30 camundongos Swiss machos com cerca de 8 semanas de idade e randomizados segundo os grupos: Controle (C), Colite Moderada (CM), Colite Grave (CG), colite Moderada suplementada com extrato de *Curcuma longa* (EX_M), colite Grave suplementada com extrato de *Curcuma longa* (EX_G). Os animais, por 30 dias, receberam apenas ração e água, então iniciou-se a fase da indução da colite por meio do SSD, sendo adicionado na água de beber em duas proporções, para a colite moderada na proporção de 3% e para a colite grave na proporção de 5% (p/v), durante 7 dias. Durante a indução, os animais dos grupos EX_M e EX_G continuaram a receber ração suplementada como extrato farmacêutico de *Curcuma longa*.

Os animais que foram suplementados, receberam extrato de *Curcuma longa* administrada na ração, tanto antes da indução da colite como durante a fase da indução da mesma. As dietas foram processadas pela ROSTHER® numa peletizadora à temperatura média de $70\text{-}80^\circ\text{C}$, e secos em estufa ventilada por 2 h, à temperatura de 65°C . Os animais

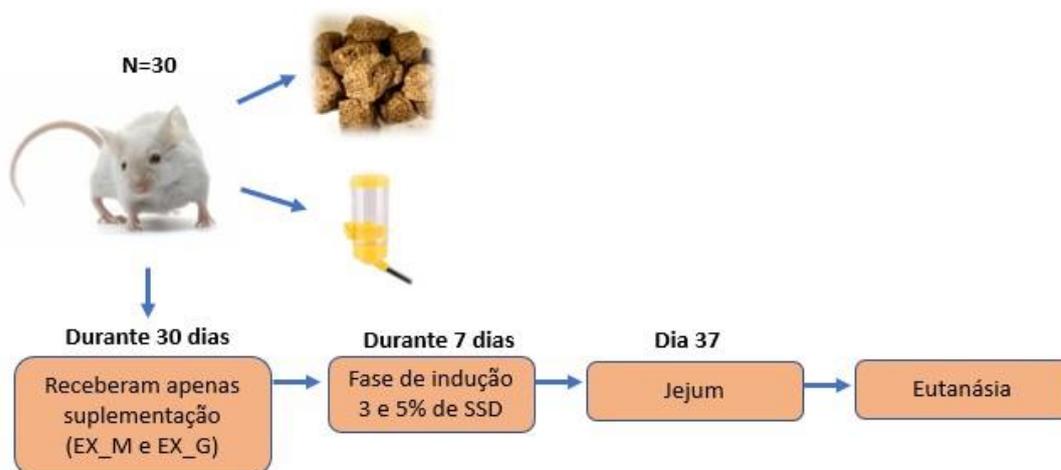
dos grupos controle, controle moderado e controle grave foram submetidos à dieta comercial ROSTHER® e os grupos suplementados receberam dieta enriquecida com extrato de açafrão (250 mg/kg peso da ração), confeccionadas a partir da dieta controle.

No 37º dia da experimentação animal, os mesmos foram deixados em jejum num período de tempo de cerca de 12 horas.

Para o procedimento de eutanásia, os camundongos foram anestesiados, utilizando 40 mg/kg de tiopental, e submetidos à coleta de sangue por punção cardíaca. Realizou-se a perfusão ventricular com heparina a 2%, e então se iniciou a retirada dos órgãos, sendo eles imersos em solução salina 0,9% e pesados em balança analítica. Os órgãos foram cortados em pedaços com massas de 25, 50 e 100 mg, transferidos para microtubos eppendorf que foram etiquetados previamente e então armazenados no freezer a -80 °C para análise posterior.

A parte final do intestino grosso, de cada animal, foi separada e armazenada em solução bouin (solução tampão contendo 10% de formol), durante 24 h, e então transferido para recipientes contendo álcool 70%. Posteriormente foi submetido a uma sequência de banhos de álcool com variadas concentrações, e inclusas em pequenos blocos de parafina para análises histológicas. Após inclusão em parafina, as peças histológicas foram cortadas, numa espessura de 5µm, utilizando micrótomo, os cortes foram fixados em lâminas e armazenados.

Figura 6 - Esquema do processo experimental dos animais com colite ulcerativa moderada e grave induzidos por SSD (3 e 5%), sendo Ex_M= grupo com colite moderada suplementado com extrato farmacêutico de *Curcuma longa* e Ex_G= grupo com colite grave suplementado com extrato farmacêutico de *Curcuma longa*.



4.3 Análises

Para preparação das amostras, foi utilizado tampão RIPA pH7,4, em uma proporção de 1:9, sendo o volume do solvente 9x a massa do tecido, afim de inibir a ação de proteases intracelulares e preservação de proteínas e compostos celulares. Os extratos teciduais foram centrifugados a 12.000 rpm (rotações por minuto), durante 20 minutos a 4 °C. Ao fim da centrifugação, o sobrenadante foi retirado, alicotado e armazenado a -80°C para as análises.

Se fez necessária a realização de análises histológicas para avaliação das micro estruturas celulares.

4.4.1 Análises Histológicas:

Partes do cólon foram colocados em solução Bouin e imersos em banhos de álcool em concentrações variadas, sendo elas de 70%, 80%, 90% e 100%, respectivamente, xilol e inclusas em parafina. Posteriormente sofreram o processo de cortes histológicos numa espessura de 5µm e fixados em lâminas. Numa bateria de banhos em álcool e xilol, as mesmas passaram pelo processo de desidratação, coloração em hematoxilina e eosina (HE) e hidratação. Após secagem, as lâminas coradas foram fotografadas em microscópio óptico com câmera digital acoplada e avaliadas.

As análises bioquímicas realizados foram referentes aos tecidos hepático e renal dos camundongos, sendo elas:

4.4.2 Análise de Marcadores da Capacidade Antioxidante.

4.4.2.1 Determinação de Superóxido Dismutase (SOD):

Os extratos de fígado e rim foram diluídos, na proporção de 1:80, com tampão PBS 50 mM, em pH 7,4. A atividade foi mensurada através de espectrofotômetro, em que a absorbância foi mensurada em 450 nm, segundo o protocolo do Kit SOD Assay – WST

Sigma, sendo o método baseado na inibição de 50%, pela SOD, da redução do WST-1 formazan, que é formado a partir da reação entre o WST-1 e o $O_2^{\cdot-}$.

Para isso adicionou-se 200 μ L da solução WST de trabalho nos poços da microplaca. Em seguida, adicionou-se 20 μ L das amostras, 20 μ L da solução enzimática e foi incubada a 37°C por 20 min. Após o tempo de incubação, foi realizada a leitura. Os resultados foram expressos em U de SOD/mg de proteína.

4.4.2.2 Determinação de Catalase (CAT):

A determinação da atividade de CAT ocorreu de acordo com o método descrito por Aebi 1984, A taxa de redução na absorvância, a 240nm, foi utilizada como índice de decomposição do H_2O_2 em água (H_2O) e oxigênio (O_2), pela CAT, sendo a quantidade de enzima necessária para decompor 1 μ mol/min de H_2O_2 . Para a realização da análise em questão, foram feitas diluições nos tecidos hepático e renal (numa proporção de 1:30 com tampão PBS 20 mM, pH 7,0), em duplicata, adição de 7,5 μ L do homogenato previamente diluído, e adição de 187,5 μ L de tampão PBS, pH 7,0. O leitor de placa foi ajustado para 37°C. A leitura ocorreu em espectrofotômetro, a 240 nm, a cada 15s, durante 5 min (20 leituras de 15s), sendo está leitura considerada o branco. Posteriormente, adicionou-se 5 μ L de H_2O_2 (1mol/L), e realizadas novamente leituras a cada 15s, durante 5min. Os resultados foram expressos em U de CAT/mg e o cálculo para concentração de catalase utilizado foi:

$$Catalase_{mg} \frac{U}{de\ prote\acute{a}na} = \frac{2,361 \times 0,67 \times (ABS_{inicial} - ABS_{final})}{ABS_{inicial} \times mg\ de\ prote\acute{a}na}$$

ABSinicial: Absorvância inicial;

ABSfinal: Absorvância final;

2,361: Fator de extinção molar multiplicado pelo volume final do poço, podendo ser tratado como uma constante.

0,67: Fator de correção do método da cubeta em relação à placa.

4.4.2.3 Determinação dos níveis de glutathiona reduzida (GSH) e oxidada (GSSG):

A determinação de GSH total e GSSG foi avaliada de acordo com técnica descrita por Tripple e Rogers, 2012., tendo como diferencial do método, a precipitação da proteína total após a centrifugação em 1.400 rpm, por 10 min. a 20°C, do homogenato, com ácido metafosfórico 5%, numa proporção de 1:1.

Para a realização da análise de GSH, o sobrenadante do homogenato desproteinizado, dos tecidos hepático e renal foram diluídos (nas proporções de 1:5 e 1:1 em tampão PBS 0,1 M + EDTA 5mM, pH 7,4). Em seguida, 30 µL do homogenato foram pipetados na micoplaca, em duplicata, adicionados 120 µL de tampão de ensaio. A reação foi então iniciada adicionando-se 50 µL da mistura de reação 1 (5,5-dithiobis (ácido 2-nitrobenzoico), DTNB 10mM e GR 4,2U/mL) e 50 µL da mistura de reação 2 (NADPH 1%g/v). A leitura foi feita durante 3 min., num comprimento de onda de 412 nm, com intervalos de 30''.

Já para a análise de GSSG, foram utilizados 50 µL do homogenato desproteinizado, diluído em tampão de ensaio numa proporção 1:10 de rim e fígado, contendo 5 µL de N-etilmaleimida (NEM) e colocado para ser centrifugado a 12.000 rpm, durante 20min. a 20°C. A solução foi incubada por 50 min. em gelo para que houvesse a complexação da NEM com a GSH. Para excluir o complexo formado (NEM-GSH), evitando a inativação da glutathion redutase (GR) que seria adicionada na reação, fez-se necessária a utilização de uma filtração, então, 200 µL foram transferidos para micoplaca e adicionados 50 µL da mistura de reação 1 e 50 µL da mistura de reação 2. A leitura foi realizada em espectrofotômetro, num comprimento de onda de 412 nm, numa cinética de 3 min. com leituras a cada 3 s. sendo os resultados expressos em nM.mg.Ptn⁻¹ para ambas as análises. Para realizar os cálculos de GSH, utilizou-se a equação abaixo:

$$\text{GSH} = \text{GSH Total} - 2x \text{GSSG}$$

4.3.3 Análise de marcadores de estresse oxidativo.

4.4.3.1 Determinação de Peróxido de Hidrogênio (H₂O₂):

A determinação de H₂O₂, foi realizada utilizando-se o método de Pick e Keisari (1980) adaptado, que se baseia na oxidação do vermelho de fenol pelo H₂O₂ mediada pela peroxidase de rabanete. Os homogenatos dos tecidos hepático e renal foram colocados em

microtubos contendo tampão de ensaio (tampão fosfato, dextrose, numa proporção de 1:25, a pH 7,0 sendo 150 µL do extrato (fígado e rim) + 340,7 µL de tampão. Em seguida foram adicionados 5 µL de vermelho de fenol (0,020 M) e 4,25µL de peroxidase de rabanete (PR). Os microtubos foram incubados a 37°C, por 30min. e após esse tempo, as amostras foram transferidas para a microplaca, em duplicata, contendo 25 µL de hidróxido de sódio (NaOH) 1M para parar a reação. A leitura foi realizada em espectrofotômetro no comprimento de onda de 610 nm (PICK; KEISARI, 1980). A concentração de H₂O₂ foi expressa em nmol.mg de proteína⁻¹, de acordo com a curva de calibração previamente estabelecida.

4.4.3.2 Determinação dos níveis de malondialdeído (MDA):

Pela técnica baseada no método adaptado por Vickie, Changchit e Chow (1990), os níveis de MDA foram mensurados, utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), por meio da detecção por UV num comprimento de onda de 270 nm, numa duração de 6min. por leitura, sendo o tempo de retenção do MDA de 2'51". Para isto, foram preparadas as amostras, em microtubos. Formam colocados 25 mg dos tecidos hepático e renal, homogeneizados com 400 µL de tampão trizma-base, pH 7,4, adicionados 40 µL de solução antioxidante de di-*terc*-butil-hidroxitolueno (BHT) e 440 µL de acetronitila, e então levados para centrifugação a 3.500 rpm, por 10min. a 4°C. O sobrenadante foi filtrado com membrana durapore de 0,22µm de poro em outro microtubo e armazenado. O volume de 20 µL da amostra filtrada foi injetada na CLAE e então a leitura foi realizada. Os valores obtidos, foram avaliados a partir da curva padrão, utilizando 1,1,3,3-tetrametoxipropano (TMP), sendo um composto precursor de MDA, e expressos em nM MDA.mg de tecido⁻¹, que posteriormente foi convertido para unidade em miligramas (mg) do tecido analisado, de acordo com a seguinte equação:

$$MDA \text{ tecidual} = \frac{MDA \text{ encontrado} \times 1000}{\text{Peso do tecido (mg)}}$$

4.3.5 Análise de marcador inflamatório.

4.4.5.1 Determinação de Mieloperoxidase (MPO):

Foi mensurada de acordo com Bradley et al.(1982), adaptado. A leitura foi feita em espectrofotômetro, a 460 nm. Foram usados 25mg do tecido renal e homogeneizados, utilizando tampão de ensaio (tampão fosfato de potássio 50 mM, 0,5% de BHTA e EDTA 5 mM em pH 6,0). As amostras foram centrifugadas a 4.000 rpm, por 15 min. a 4 °C e após a centrifugação, o sobrenadante foi retirado e passou novamente pelo processo de centrifugação, agora a 12.000 rpm com a mesma duração de tempo e temperatura. Então 50 µL de BHTA e 50 µL das amostras foram pipetadas na microplaca, em duplicata, 50 µL de solução de *orto*-dianisina (0,68 mg/mL) foram adicionados. A microplaca foi incubada a 37 °C por 15 min. e, em seguida adicionados 50 µL de solução de H₂O₂ (3%). Foi realizada uma nova incubação, a 37 °C por 10 min. e então realizada a leitura. Uma unidade de MPO é definida como a quantidade de H₂O₂ em µmol decomposta por min. Os resultados foram expressos em U de MPO/mg de proteína, de acordo com fórmula específica.

$$\% \text{oxidação de peróxido de hidrogênio} = \left[1 - \left(\frac{\Delta Ab}{\Delta A} \right) \right] \times 100 \times 17,6$$

ΔA: Variação de absorvância na amostra

ΔAb: Variação de absorvância no branco

4.4 Análise Estatística.

Para as análises estatísticas, foi utilizado o teste de Kolmogorov-Smirnov, e variáveis paramétricas foram avaliadas por análise unidimensional de variância (ANOVA), seguida do teste de Tukey/teste de Bonferoni para as comparações entre grupos. Utilizou-se ainda o teste T para análises entre 2 grupos. O teste de Kruskal-Willis foi utilizado para avaliar as variáveis não paramétricas e o pós teste de Mann Whitney. Os resultados foram apresentados como média ± erro padrão (SEM) para aqueles com distribuição normal, e como mediana e intervalo interquartil para os não-paramétricos. O valor p < 0,05 foi considerado estatisticamente significativo. Foi utilizado GraphPad® Prism versão 5.0 para Windows (San Diego, CA, EUA).

4.5 Aspectos Éticos.

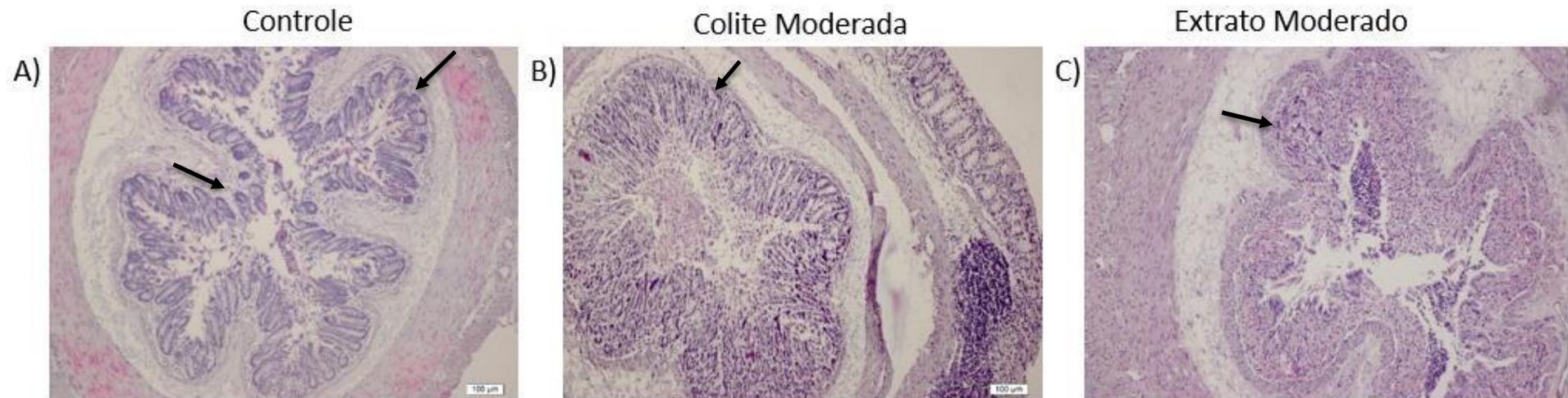
O projeto foi submetido ao Comitê De Ética Em Pesquisa da UFAL, vinculado ao Conselho Nacional de Saúde do Ministério de Saúde (ANS/MS/Brasil), tendo sido aprovado sob o número do processo 45/2016, Anexo 1, com base nas normas internacionais (Declaração Universal dos Direitos do Animal – UNESCO -15/10/1978), nacionais (Lei 6.638 de 08/05/1979) e Lei Arouca: 11.794/2008.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados são referentes a análise das imagens histológicas, atividade de MPO, uma enzima com amplas ações biológicas relacionado a efeitos deletérios que ocorrem nos processos de inflamação em eventos como apoptose e condução do processo inflamatório, atividades antioxidantes, estes sendo enzimático, como a SOD, que age catalizando a dismutação do radical ânion superóxido em H_2O_2 e O_2 , a CAT, que degrada o H_2O_2 em H_2O e O_2 , e não enzimático, como a glutatona peroxidase (GPx), que catalisa o H_2O_2 , que não foi degradado pela CAT, em água e oxigênio, e operando num ciclo com sua forma oxidada (GSSH) e reduzida (GSH), a GSH reduz o H_2O_2 a H_2O na presença de GPx, formando uma ponte dissulfeto e se regenerando novamente. Em um desbalanço redox, o GSH é convertido em GSSG, o que leva a uma diminuição da razão GSH/GSSG (BARREIROS, A.; DAVID, J., 2006).

As figuras 7 e 8 retratam imagens histológicas referentes a cólon, obtidas através de microscópio óptico com máquina digital acoplada. Observa-se que o tratamento com o extrato de *Curcuma longa* minimizou os danos histológicos, na arquitetura colônica, em ambos os modelos de colite, especialmente na manutenção das vilosidades. Histologicamente, o extrato de *Curcuma longa* conseguiu minimizar os danos na arquitetura colônica, como destruição de vilosidades e estreitamento de lâmina própria, demonstrando seu efeito protetor entre os animais colite moderada e grave.

Figura 7 - Aspectos histológicos do cólon de camundongos com colite ulcerativa induzida por sulfato de sódio dextrana: (coloração com hematoxilina e eosina -HE) nível moderado de colite.



Legenda: A) Histologia do grupo Controle; B) Histologia do grupo colite Moderada; C) Histologia do grupo com colite moderada suplementado com extrato de *Curcuma longa* (C) utilizando microscópio óptico com câmera digital acoplada em uma aumentode 20X.

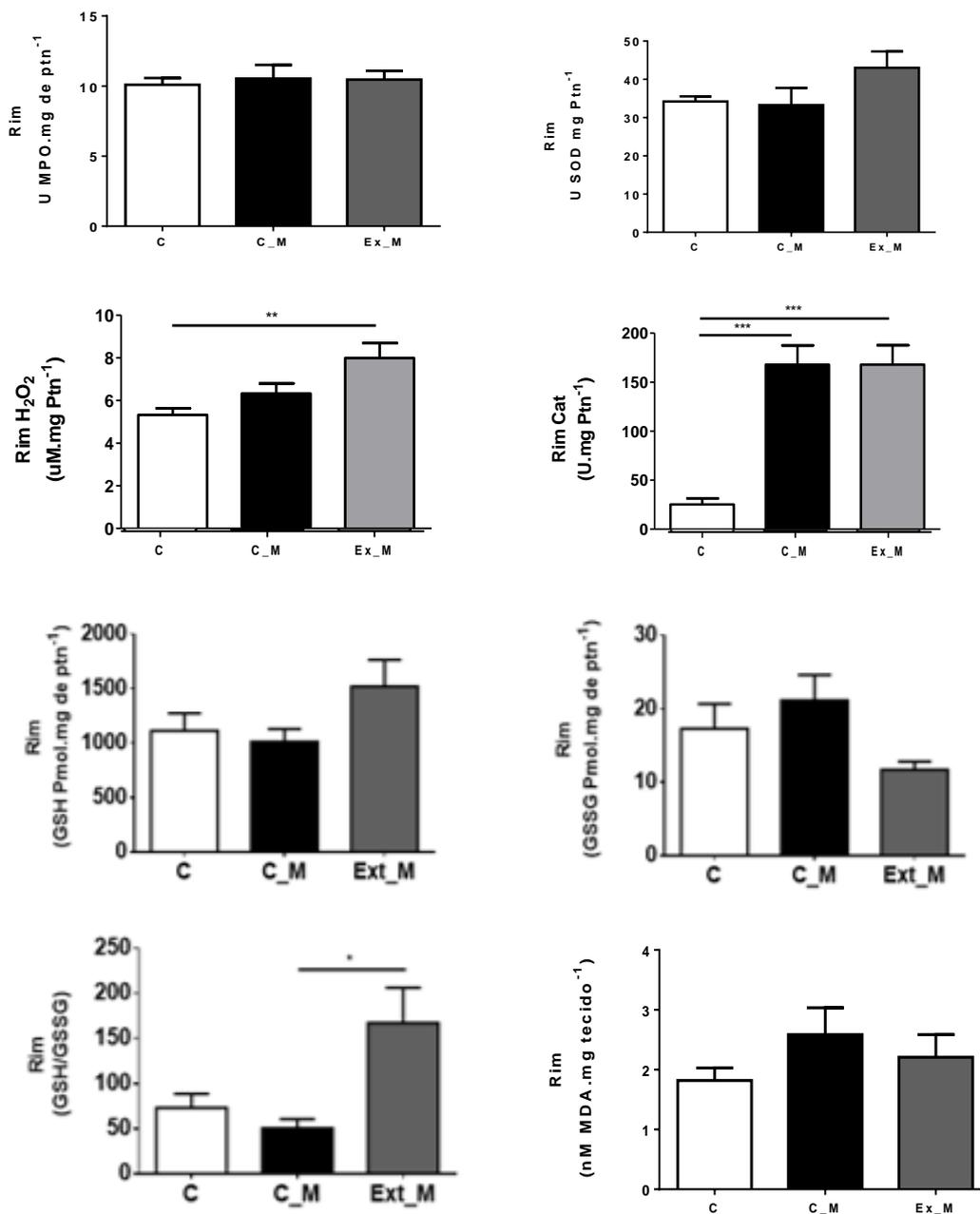
Figura 8 - Aspectos histológicos do cólon de camundongos com colite ulcerativa induzida por sulfato de sódio dextrana: (coloração com hematoxilina e eosina - HE) nível grave de colite.



Legenda: A) Histologia do grupo Controle; B) Histologia do grupo colite Grave; C) Histologia do grupo com colite grave suplementado com extrato de *Curcuma longa* (C) utilizando microscópio óptico com câmera digital acoplada em uma aumentode 20X.

Na figura 9 pode-se observar nas análises alterações nos níveis de H_2O_2 e razão GSH/GSSG no grupo Ex_M e CAT nos grupos C_M e Ex_M no nível moderado de indução colite.

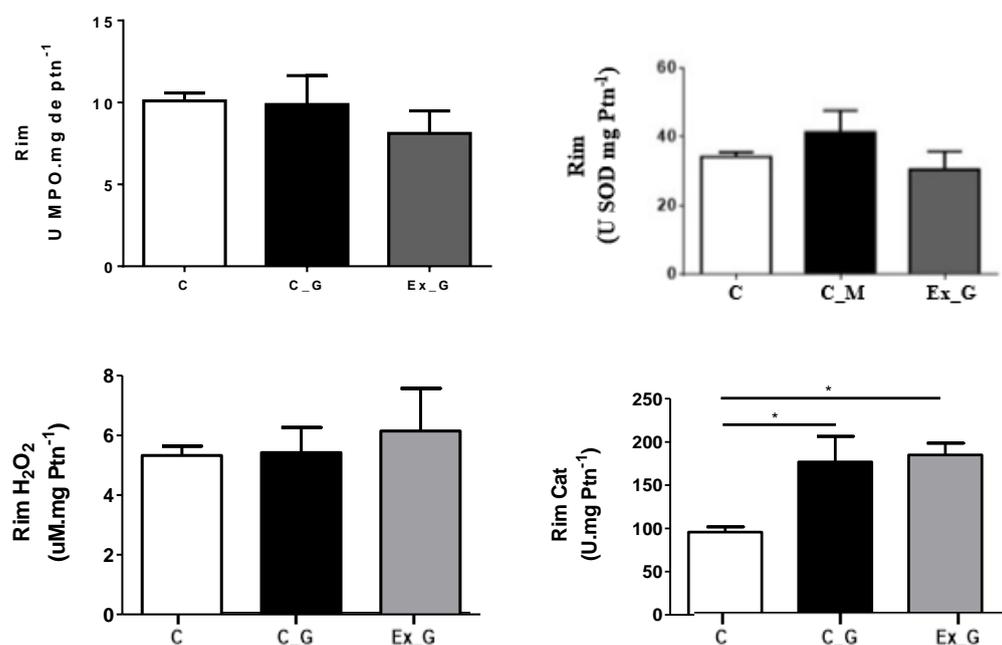
Figura 9 - Níveis de MPO, SOD, H_2O_2 , SOD, CAT, GSH, GSSG, razão GSH/GSSG e MDA referentes ao tecido renal de animais dos grupos Controle (C), Controle Moderado (C_M), grupo com colite moderada suplementado com Extrato de Curcuma longa (Ex_M) induzidos por SSD 3%.

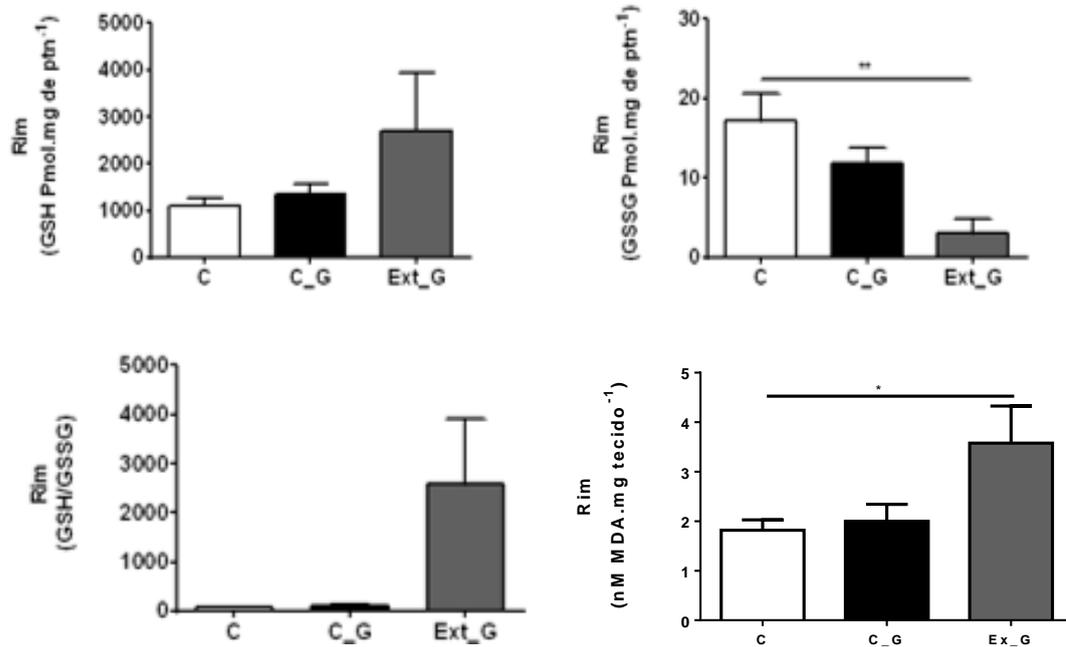


A atividade de MPO indica que possivelmente não houve ação da colite sobre o tecido renal no nível moderado da doença, bem como não houve alteração estatística nos níveis de MDA, não sendo evidenciados danos à membrana lipídica. Observa-se que os níveis de CAT foram elevados e a suplementação com *Curcuma longa* não influenciou na mudança desses níveis. Os níveis de GSH foram mais elevados biologicamente, entretanto não apresentam diferença estatística entre os grupos (vs C e C_M) e da mesma forma, pode-se observar uma tendência na diminuição de GSSG, porém sem apresentar diferença estatística, contudo resultou numa elevação da razão em relação ao grupo induzido a colite ou C_M, indicando um possível aumento da forma reduzida do tripeptídeo. Houve aumento significativo de H₂O₂ do grupo suplementando vs grupo C.

A figura 10 nos mostra elevação nos níveis de CAT nos grupos C_G e Ex_G e MDA no grupo Ex_G e diminuição nos níveis de GSSG dos grupos induzidos a colite, não havendo mais diferença estatística significativa nos demais biomarcadores.

Figura 10 - Níveis de MPO, SOD, H₂O₂, SOD, CAT, GSH, GSSG, razão GSH/GSSG e MDA referentes ao tecido renal de animais dos grupos Controle (C), Controle Grave (C_G), grupo com colite grave suplementado com Extrato de *Curcuma longa* (Ex_G) induzidos por SSD 5%.



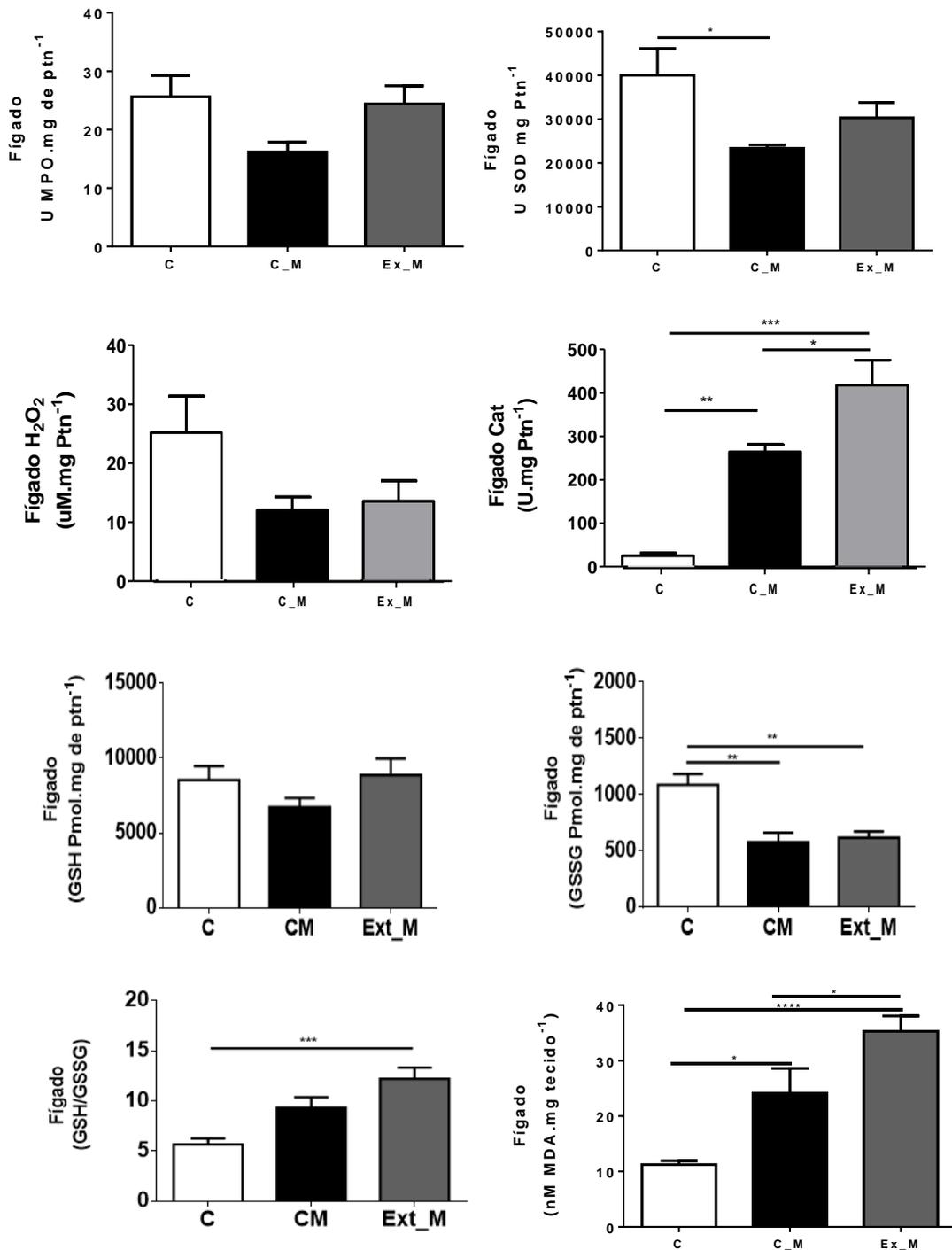


Não se verificou diferença estatística nas dosagens de MPO, H₂O₂ ou de atividade da SOD no nível grave de indução, e observou-se um aumento na atividade enzimática da CAT em comparação ao grupo C_G e Ex_G vs grupo C, seguindo uma tendência já vista nos grupos moderados. Referente aos níveis de MDA, houve aumento significativo do grupo suplementado quando comparado ao grupo controle, percebe-se que no nível grave, o tratamento propiciou o aumento da formação desse biomarcador de oxidação. Observa-se que existe uma tendência no aumento de GSH no Ex_G seguido da diminuição nos níveis de GSSG e um aumento na sua razão GSH/GSSG, que, contudo, não foi suficiente para haver diferença estatística tanto em GSH como em sua razão.

Em estudos de nefropatia diabética, feita por Ibrahim et al, (2016) a curcumina se mostrou protetora no tecido renal em experimentação com ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina, sendo eficaz na prevenção do estresse, onde a atividade de SOD e os níveis de GPx nos grupos doentes foram diminuídos significativamente, e nos grupos suplementados com curcuma esses níveis foram aumentados, se comparando aos do grupo controle. No trabalho de Mohebbati et al, (2016) que avaliou o estresse oxidativo induzido por adriamicina em ratos, os níveis de MDA foram diminuídos significativamente com o uso de curcuma e também houve aumento da atividade de SOD, que foi potencializada na combinação entre *C. longa* + *N. sativa*.

Os níveis de CAT e MDA dos grupos C_M e Ex_M foram avaliados comparados ao grupo controle, e diminuídos nos níveis de GSSG (Fig. 11).

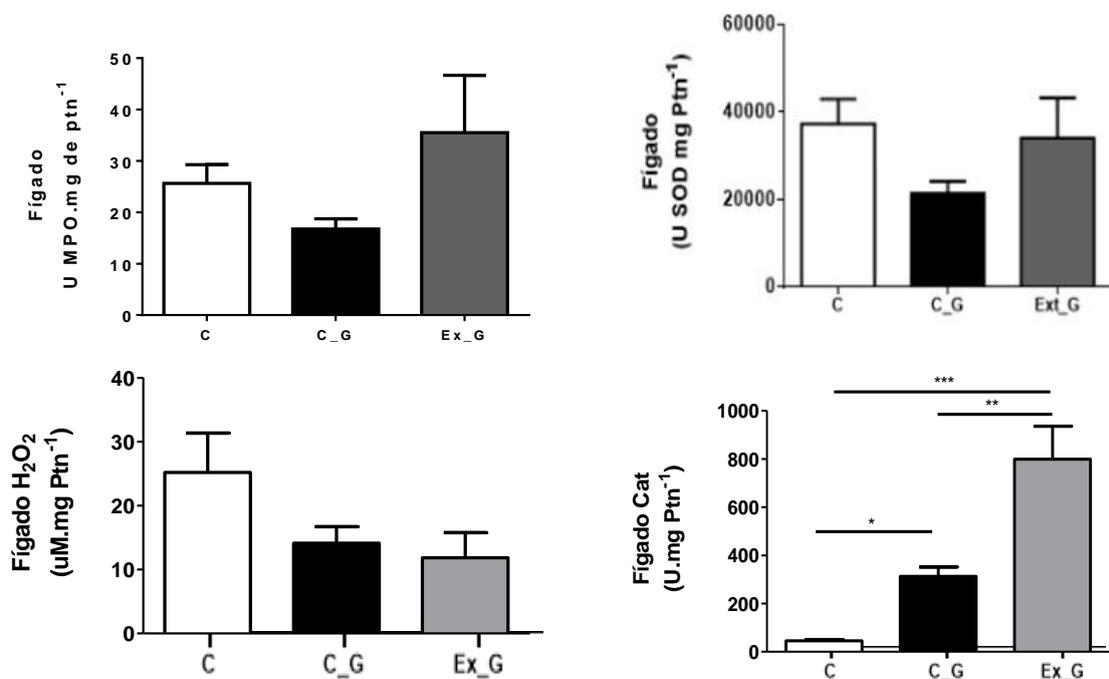
Figura 11 - Níveis de MPO, SOD, H₂O₂, SOD, CAT, GSH, GSSG, razão GSH/GSSG e MDA referentes ao tecido hepático de animais dos grupos Controle (C), Controle Moderado (C_M), grupo com colite moderada suplementado com Extrato de *Curcuma longa* (Ex_M) induzidos por SSD 3%.

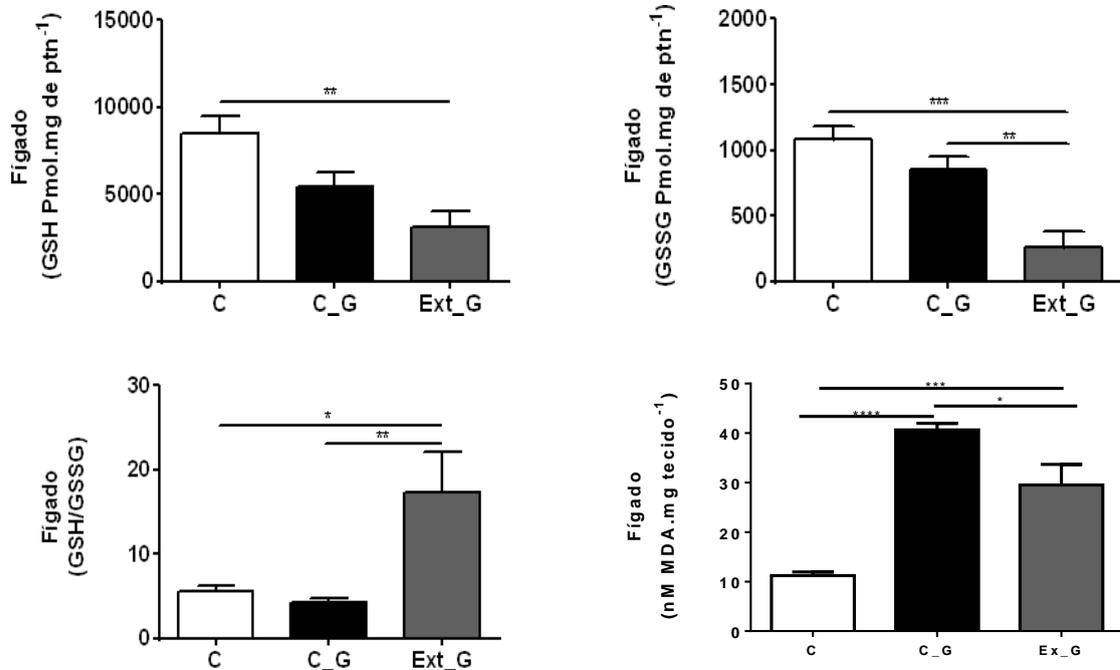


No tecido hepático, observa-se que os níveis de MPO do grupo Ex_M e C são equivalentes, porém no MDA no grupo suplementado com *Curcuma longa* e o grupo induzido a colite moderada, os níveis são maiores que o grupo C, sendo o tratamento favorável para formação desse aldeído (*vs* C e C_M) apresentando maior dano à membrana lipídica. Os níveis de SOD do grupo C_M apresentaram diferença estatística (*vs* C), o nível no grupo Ex_M também foi menor, porém sem diferença estatística (*vs* C), houve uma elevação da atividade de CAT, que possibilitou menores níveis de H₂O₂, em ambos os grupos. No presente estudo, obteve-se concentrações menores de GSSG tanto para o grupo doente quanto para o grupo suplementado *vs* C, sendo que no grupo suplementado com extrato de *Curcuma longa* houve uma elevação da sua razão GSH/GSSG (*vs* C).

Os níveis de CAT, H₂O₂ e a razão GSH/GSSG do grupo Ex_G foram elevados quando comparados ao grupo C e diminuídos nos níveis de GSH e GSSG. Já nos níveis de MDA se percebe aumento tanto no grupo C_G quando no grupo Ex_G, visto abaixo (Fig 12).

Figura 12 - Níveis de MPO, SOD, H₂O₂, SOD, CAT, GSH, GSSG, razão GSH/GSSG e MDA referentes ao tecido hepático de animais dos grupos Controle (C), Controle Grave (C_G), grupo com colite grave suplementado com Extrato de *Curcuma longa* (Ex_G) induzidos por SSD 5%.





No nível grave da doença, não vemos diferença estatística nos grupos, quando dosada a atividade de SOD, porém se observa que, no grupo doente, os níveis de MDA foram elevados significativamente (*vs* C e Ex_G), mesmo o grupo Ex_G mostrando diminuição do dano em comparação ao grupo induzido, não foi suficiente para que houvesse normalização dos níveis comparado ao grupo C, possivelmente pela extensão do dano causado aos animais induzidos ao nível grave da doença. Observa-se um aumento na atividade da CAT, numa possível tentativa de normalizar o dano causado, havendo maior atividade enzimática no grupo Ex_G mais expressivo (*vs* C e C_G), podendo ser decorrente da atividade redox dos curcuminóides, como também foi observado no nível p moderado da doença, e que não foram seguidos de diferença em relação ao H₂O₂. Vê-se uma menor concentração de GSH (*vs* C), havendo paralelamente, uma diminuição dos níveis de GSSG (*vs* C e CG), o que resultou numa elevação da sua razão (*vs* C e CG).

A *Cucuma longa* tem mostrado potencial para prevenção de hepatotoxicidade, embora as informações não sejam abundantes, mas seu uso diminui níveis de produção de EROs que levam à disfunção hepática. No estudo feito por Samarghandian et al, (2017) em ratos para avaliação dos efeitos antioxidantes da curcumina frente o estresse oxidativo induzido tanto em rim quanto em fígado, a atividade de SOD, CAT e os níveis de GSH foram reduzidas, o que também difere em atividade de CAT obtido neste trabalho.

Os resultados obtidos no tabalhos foram reunidos e apresentados abaixo (Quadro 1).

Quadro 1 - Resultados dos marcadores analisados referentes aos grupos suplementados com extrato farmacêutico de *Curcuma longa* no tecido renal e hepático de camundongos com colite ulcerativa nos níveis moderado e grave de indução por SSD.

Marcadores	Tecido Renal		Tecido Hepático	
	Moderado	Grave	Moderado	Grave
MPO	Não houve alteração no marcador inflamatório.	Não houve alteração no marcador inflamatório.	Não houve alteração no marcador inflamatório.	Houve elevação do grupo Ex_G, sem diferença estatística.
SOD	Elevação do grupo Ex_M (vs C e C_M), sem diferença estatística.	Não houve alteração.	Diminuição do grupo Ex_M (vs C), mas elevação do grupo Ex_M (vs C_M).	Elevação do grupo Ex_G (vs C_G), sem diferença estatística.
H₂O₂	↑ Elevação nos níveis, do grupo Ex_M.	Não houve alteração.	Houve diminuição dos grupos Ex_M e C_M (vs C), sem diferença estatística.	Houve diminuição dos grupos Ex_G e C_G (vs C), sem diferença estatística.
CAT	Elevação ns níveis enzimático de CAT no grupo C_M e Ex_M (vs C), a suplementação não influenciou.	Elevação ns níveis enzimático de CAT no grupo C_G e Ex_G (vs C), a suplementação não influenciou.	Elevação ns níveis enzimático de CAT no grupo Ex_M (vs C e C_M).	↑ Elevação ns níveis enzimático de CAT no grupo Ex_G (vs C e C_G).
GSH	Elevação nos níveis do grupo Ex_M (vs C e C_M), sem diferença estatística.	Elevação nos níveis do grupo Ex_M (vs C e C_G), sem diferença estatística.	Não houve alteração.	↓ Diminuição do grupo Ex_G (vs C)
GSSG	Diminuição do grupo Ex_M (vs C e C_M), sem diferença estatística.	↓ Diminuição do grupo Ex_G (vs C e C_G).	↓ Diminuição dos grupos C_M e Ex_M (vs C)	↓ Diminuição dos grupos e Ex_M (vs C e C_G).
Razão	↑ Elevação do grupo Ex_M.	Elevação do grupo Ex_G, sem	↑ Elevação da razão no grupo	↑ Elevação da razão no grupo

GSH/GSSG		diferença estatística.	Ex_M (vs C).	Ex_G (vs C e C_G).
MDA	Não houve alteração.	↑ Elevação nos níveis do marcador de dano oxidativo no grupo Ex_G.	↑ Elevação do grupo Ex_M (vs C e C_M).	↓ Elevação do grupo Ex_G (vs C) e diminuição do grupo Ex_G(vs C_M).

Legenda: Elevação dos níveis com diferença estatística significativa (↑); Diminuição dos níveis com diferença estatística significativa (↓).

5 CONCLUSÃO

- No estudo realizado, experimentação com modelo animal utilizando SSD na água de beber num período de 7 dias, foi possível observar que houve indução tanto no nível moderado quanto grave da colite evidenciados por análises histológicas do intestino por HE, e que o uso da suplementação de *Curcuma longa* por 30 dias resultou num efeito protetor, minimizando danos e destruição do tecido lesionado.
- A partir das análises realizadas em tecidos extra intestinais, na colite moderada referente ao tecido renal, foi observado aumento de H_2O_2 no grupo tratado com *Curcuma longa*, aumento na razão GSH/GSSG, e não se observou dano oxidativo, sendo grupo suplementado ou não. No nível grave de indução da doença, foi possível observar dano oxidativo no grupo tratado com *Curcuma longa*, sugerindo que a suplementação propiciou o aumento dos níveis de MDA, porém sem alteração estatisticamente significativa para SOD, MPO e H_2O_2 .
- No tecido hepático, na indução moderada da colite, a oferta de curcuma resultou na elevação dos níveis de CAT, SOD e razão GSH/GSSG, porém também numa elevação de MDA. Já no nível grave de colite, o tratamento proporcionou aumento de CAT, que não foi seguida da diminuição dos níveis de H_2O_2 , elevação da razão GSH/GSSG e diminuição de MDA.
- As manifestações extra intestinais não são amplamente estudadas, e mais estudos precisam ser realizados para que haja melhor elucidação, inclusive da DII, pois há várias possibilidades, fatores, vias e mecanismos que podem estar associados ao processo inflamatório que influenciam no tratamento, bem como maneiras de melhor obter resultados favoráveis nestes tratamentos alternativos, uma vez que a *Curcuma longa* se mostra promissora no tratamento de DII e assim proporcionar melhor qualidade de vida para os portadores da mesma.

6 PERSPECTIVAS

Frente aos resultados obtidos, percebe-se a importância do aprofundamento do trabalho e espera-se continuidade da pesquisa referente às manifestações extra intestinais e tratamentos, no estudo e ao uso terapêutico da *Curcuma longa*, no contexto da colite ulcerativa, avaliação e investigação de outras vias e possíveis mecanismos que a *Curcuma longa* exerce na ação antioxidante ou pró-oxidante nos tecidos extra intestinais, para elucidar e estabelecer terapias mais seguras e eficazes frente a colite.

REFERÊNCIAS

ACHOTEI, D.; GOLOGAN, E. STEFANESCU, G. BALAN, G. Clinical, biological and epidemiological aspects of inflammatory bowel diseases in North-East Romania. **Med Chir Soc Med Nat Iasi**, v. 117, p. 16-22, 2013.

AGGARWAL, B. B.; SURH, YOUNG-JOON; SHISHODIA, S. Os alvos moleculares e usos terapêuticos da curcumina na saúde. **Avanços em medicina experimental e biologia**, v. 595, p. 105-125, 2007.

ARGENTA, S. C.; ARGENTA, L. C.; GIACOMELLI, S. R. CEZAROTTO, V. S. Plantas medicinais: cultura popular versus ciência. **Revista Eletrônica de Extensão da URI**, v. 7, n.12, p. 51-60, 2011.

BARROS, B. F. A. M. Abordagem da crise severa de colite. **Tese de Mestrado** Integrado em Medicina do Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar – Universidade do Porto, 2021.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J.P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 113-123, 2006.

BARROS, G. V. N.; SILVA, T.S. S.; BRITO, A. P. S. O.; GARCIA, H. C. R.; MANESCHY, R. B. Métodos, diagnósticos e terapêuticos das doenças inflamatórias intestinais: revisão sistemática. **Journal Pará Research Medical**, v. 4, p. 4-9, 2020.

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

BRADLEY, P. P; PRIEBAT, D. A.; CHRISTENSEN, R. D.; ROTHSTEIN, C. G. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with na enzyme marker. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 78, n. 3, p. 206-2209, 1982.

BRITO, R. C. V.; PEREZ, C. L.; SILVEIRA, K. A. F.; ARRUDA, E. L.; JUNIOR, M. P. A. Doenças inflamatórias intestinais no brasil: perfil das internações, entre os anos de 2009 a 2019. **Educação em Saúde**, v.8, n. 1, p. 127-135, 2020.

CAMBUI, Y. R.S.; NATALI, M. R. M. Doenças inflamatórias intestinais: revisão narrativa da literatura. **Revista da Faculdade de Ciências Médicas de Sorocaba**, v.15, n.3, p. 116-119, 2015.

CAMATARI, F.O. Determinação de curcuminóides e avaliação da capacidade antioxidante contra espécies reativas de oxigênio e nitrogênio de extratos de curcuma longa e constituintes isolados. **Tese de Doutorado em Química e Biotecnologia** do Instituto de Química e Biotecnologia – Universidade Federal de Alagoas, 2017.

CADIRCI, E., SULEYMAN, H., AKSOY, H., HALICI, Z., OZGEN, U., KOC, A., OZTURK, N. Effects of onosma armeniacum root extract on ethanolinduced oxidative stress in stomach tissue of rats. **Chemico-Biological Interactions** v. 170, p. 40–48, 2007.

CORICA, D.; ROMANO, C. Renal involvement in inflammatory bowel diseases. **Journal of Crohn's and Colitis Advance Access**, p. 1-26, 2015.

FADUS, M. C.; LAU, C.; BIKHCHANDANI, J.; LYNCH, H. T. Curcumin: a age-old anti-inflammatory and anti-neoplastic agent. **Journal of Traditional and Complementary Medicine**, v. 7, n.3, p. 339-346, 2017.

FAROMBI, E.O et al. Kolaviron, a natural antioxidant and anti-inflammatory phytochemical prevents dextran sulfate sodium-induced colitis in rats. **Basic & clinical pharmacology & toxicology**, v.113, n.1, p. 49-55, 2013.

FERRAZ, F. Panorama geral sobre doenças inflamatórias intestinais: imunidade e suscetibilidade da doença de crohn e colite ulcerativa. **Journal of Health Sciences**, v.18, n. 2, p. 139-143, 2016.

GUPTA, S. C.; PATCHVA, S.; AGGARWAL, B. B. Discovery of curcumin, a component of golden spice and its miraculous biological activities. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 39, n. 3, p.283-299, 2012.

PALMA, H. E. Parâmetro de estresse oxidativo no sangue, fígado e rins de ratos diabéticos tratados com curcumina e/ou insulina. **Dissertação de Mestrado em Medicina Veterinária** da Universidade Federal de Santa Maria 2013.

KAYAL, M.; SHAH, S. Ulcerative colitis: current and emerging treatment strategies. **Journal of Clinical Medicine**, v. 9, n. 94, p. 1-12, 2020.

- KESHAVARZIAN, A. et al. Increases in free radicals and cytoskeletal protein oxidation and nitration in the colon of patients with inflammatory bowel disease, **Journal Gut**, v. 52, n. 5, p. 720-728, 2003.
- KUNNUMAKKARA, A. B. et al. Curcumin, the gold nutraceutical: multitargeting for multiple chronic diseases. **British Journal of Pharmacology**, v.174, n.11, p. 1325-1348, 2016.
- KUNUWAR, A.; PRIYADARSINI, K. I. Curcumin and its role in chronic diseases. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 928, p. 1-25, 2016.
- LAO, C. D. et al. Dose escalation of a curcuminoid formulation. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v 6, p. 4-7, 2006.
- LOFTUS, E. V. et al. Long-term efficacy of vedolizumab for ulcerative colitis. **Journal of Crohn' and Colitis**, v. 11, n. 4, p. 400-411, 2017.
- LUBBAD, A.; ORIOWO, M. A.; KHAN, I. Curcumin attenuates inflammation through inhibition of TLR-4 receptor in experimental colitis. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 322, n. 1-2, p. 127-135, 2009.
- MACIEL, M. A. M. et al. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**. v. 25, n.3, p. 429-438, 2002.
- MARTELLI, F.; NUNES, F. M. F. Radicais livres; em busca do equilíbrio. **Ciência e Cultura**, v. 66, n. 3, p. 54-57, 2014.
- MARTINEZ, C. A. R. et al. The importance of oxygen free radicals in the etiopathogenesis of diversion colitis in rats. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 25, n. 3, p. 387-395.
- MOHEBBATI, R. et al. Adriamycin induced oxidative stress is prevented by mixed hydro-alcoholic extract of nigella sativa and curcuma longa in rat kidney. **Avicenna Journal of Phytomedicine**, v. 6, n. 1, p. 86-94, 2016.
- GUPTA, S. C.; SRIDEVI, P.; BHARAT, A. B. Discovery of curcumin, a component of the golden spice, and its miraculous biological activities. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 39, n. 3, p. 283-299, 2012.

GROTTO, D.; CARDOSO, S. G. Avaliação da estabilidade do marcador plasmático do estresse oxidativo: malondialdeído. **Química Nova**, v.31, n.2, p. 275-279, 2008.

HABR-GAMA, A. et al. Doença de Crohn intestinal: manejo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 57, n. 1, p. 10–13, 2011.

HUANG, Y.; CHEN, Z. Inflammatory bowel disease related innate immunity and adaptive immunity. **American Journal of Translational Research**, v. 8, n. 6, p. 2490-2497, 2016.

IBRAHIM, Z. S.; ALKAFATY, M. E.; AHMED, M. M.; SOLIMAN, M. M. Renoprotective effect of curcumin against the combined oxidative stress of diabetes and nicotine in rats. **Molecular Medicine Reports**, v. 13, n. 4, p. 3017-3016, 2016.

LOPETUSO, L.; GASBARRINI, A. IBD: Colite ulcerosa. **Recenti Prog Med**, n. 107, p. 297-308, 2016.

MENON, V. P.; SUDHEER, A. R. Antioxidant and anti-inflammatory proprieties of curcumin. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 595, p. 105-125, 2007.

MOTA, E. S. et al. I. Extra-intestinal manifestations crohn disease and ulcerative retocolitis: prevalence and correlation with diagnosis, extension, activity, disease evolucion time. **Revista Brasileira de Coloproctologia**, v. 27, n. 4, p. 349-363, 2007.

MOURA, F. et al. Antioxidant therapy for treatment of inflammatory bowel disease: does it work?. **Redox Biology**, v. 6, p. 617-639, 2015.

PEDRSO S.; ANDRADE, G.; PIRES, R. H. Plantas medicinais: uma abordagem sobreo uso seguro e racional. **Revista de Saúde Coletiva**, v. 31, n. 2, p.1-19, 2021.

PERVEEN, H. et al. Electrozymographic evaluation of the attenuation of arsenic induced degradation of hepatic sod, catalase in an in vitro assay system by pectic polysaccharides of *momordica charantina* in combination with curcumin. **Biochemistry and Biophysics Reports**, v. 11, p. 64-71, 2017.

PRIYADARSINI, K. I. The chemistry of curcumin: From extraction to therapeutic agente. **Journal Molecules** v. 19, n. 12, p. 20091-20112, 2014.

PRAVDA J. Radical induction theory of ulcerative colitis. **World Journal of Gastroenterology**, v. 11, n. 16, p. 2371-2384, 2005.

PRAVDA J. Can ulcerative colitis be cured? **Discov Med** v. 27, n. 149, p. 197-200, 2019.

PRIOR, R. L. Oxygen radical absorbance capacity: new horizons in relating dietary antioxidants/bioactives and health benefits. **Journal of Functional Foods**, v. 18, p. 791-810, 2015.

ROBERT-THOMPSON, I. C.; BRYANT, R. V.; COSTELLO, D. P. Uncovering the cause of ulcerative colitis. **JGH Open** v. 3, n. 4, p. 274-276, 2019.

SHAMI, N. J. I. E.; MOREIRA, E.D.M. Lycopene as an antioxidant agent. **Revista de Nutrição**, v. 17, n. 3, p. 227-236, 2004.

SANDBORN, W. J. et al. Adalimumab induces and maintains clinical remission in patients with moderate to severe ulcerative colitis. **Gastroenterology**, v. 142, n. 2, p. 257-265, 2012.

SANDBORN, W. J. et al. Tofacitinib as induction and maintenance therapy for ulcerative colitis. **New England Journal of medicine**, v. 376, n. 18, p. 1723-1736, 2017.

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

SILVA, J.; BRITO, B. S. et al. Frequency of hepatobiliary manifestations and concomitant liver disease in inflammatory bowel disease patients. **Bio Med Research International**, v. 2019, p. 1-7, 2019.

SUETH-SANTIAGO, V.; MENDES-SILVA, G. P.; DECOTÉ-RICARDO, D.; DE LIMA, M. E. F. Curcumina, o pó dourado do açafrão-da-terra: intropesção sobre química e atividades biológicas. **Química Nova**, v. 38, n.4, p. 538-552, 2015.

STROBER, W.; LUDVIKSSON, B. R.; FUSS, I. J. The pathogenesis of mucosal inflammation in murine models of inflammatory bowel disease and Crohn disease. **Ann Intern Med**, v. 128, p. 848-856, 1998.

WITAICENIS, A. et al. Suppression of tnbs induced colitis in rats by 4-metilesculetina, a natrual coumarin: comparison with prednisolone and sulphasalazine. **Chemico-Biological Interactions**, v. 195, n. 1, p. 76-85, 2012.