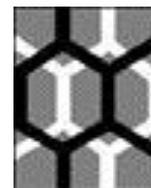




Universidade Federal de Alagoas - UFAL

Instituto de Química e Biotecnologia- IQB



Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia – PPGQB

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

ORLANDO ROBERTO PIMENTEL DE ARAÚJO

Maceió-AL

2019

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 DEXTRANO

ORLANDO ROBERTO PIMENTEL DE ARAÚJO

Defesa de tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Química e Biotecnologia, como requisito necessário para a obtenção do título de Doutor em Química.

Orientadora: Marília Oliveira Fonseca Goulart

Co-orientadora: Fabiana Andrea Moura

Maceió-AL

2019

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central

Bibliotecário: Marcelino de Carvalho

A663a Araújo, Orlando Roberto Pimentel 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 / Orlando Roberto Pimentel de Araújo. – 2019.
142 f. : il.

Orientadora: Marília Oliveira Fonseca Goulart.

Co-orientadora: Fabiana Andrea Moura.

Tese (Doutorado em ciências) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Química e Biotecnologia. Maceió, 2019.

Inclui bibliografia e Anexo.

1. *Curcuma*. 2. Estresse oxidativo. 3. Malondialdeído. 4. Citocinas.
5. Colite ulcerativa. 6. Interleucinas. I. Título.

CDU:633.88:616.34



PPGQB

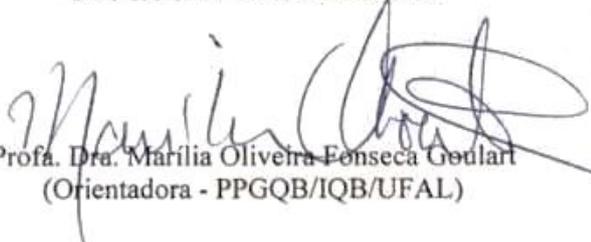
Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia

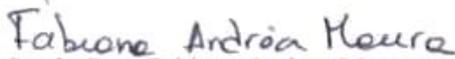


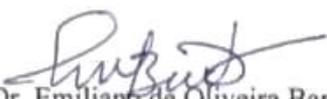
FOLHA DE APROVAÇÃO

Membros da Comissão Julgadora da Defesa de Tese do Doutorando **ORLANDO ROBERTO PIMENTEL DE ARAÚJO** intitulada: "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", apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas, no dia 15 de fevereiro de 2019, às 14h, na Sala de Reuniões do IQB.

COMISSÃO JULGADORA:


Profa. Dra. Marília Oliveira-Fonseca Goulart
(Orientadora - PPGQB/IQB/UFAL)


Profa. Dra. Fabiana Andrea Moura
(Coorientadora - FANUT/UFAL)


Prof. Dr. Emiliano de Oliveira Barreto
(ICBS/UFAL)


Profa. Dra. Terezinha da Rocha Ataíde
(FANUT/UFAL)


Prof. Dr. Francis Soares Gomes
(PPGQB/IQB/UFAL)


Profa. Dra. Valéria Nunes de Souza
(CCB/UFPE)

Dedico este trabalho a: *in memoriam* minha amada mãe, Nara Francisca Pimentel Cavalcante[†], a dor que sinto só irá acabar quando nos encontrarmos novamente, e nos seus abraços você me acalantar.

Saudade eterna.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, à minha mãe, por tudo que me ensinou, principalmente a gratidão a Deus, por todo amor e sacrifício, um exemplo de mãe, mulher e cristã.

À minha orientadora, professora Dr.^a Marília Oliveira Fonseca Goulart, pela abertura de portas no Laboratório de Eletroquímica, por toda a paciência e ajuda em todo o decorrer de meu caminho.

À minha co-orientadora, professora Dr.^a Fabiana Andrea Moura, por todo conhecimento repartido, pela amizade única e toda dedicação no momento mais difícil que passei.

Aos professores Euzébio, Luiza, Emiliano, Salete e Josué pela atenção e ajuda no decorrer do projeto.

A todos os professores do curso de química, aos técnicos e pessoal dos serviços gerais que sempre foram solícitos nos mais diversos momentos.

A Dr.^a. Fabiana Santos Camarati pela amizade e toda a colaboração no auxílio no projeto e conhecimento compartilhado, inclusive com dados imprescindíveis à realização do presente trabalho.

Aos meus amigos: Amylly, Jamerson, Kívia, John, Nicholas, Juliana, Samara, Lourdinha, Marilene, Glenn, André, entre outros do grupo de eletroquímica.

Aos meus amigos pessoais Fabricio, Aída, Henrique, Humberto, Ane Vanessa e Adeílido por todo carinho e ajuda.

A minha sogra, Ana Lúcia, minha cunhada, Elizabeth, e meu sogro, Ivanildo, por toda dedicação e carinho e amizade, serei eternamente grato.

Aos órgãos de fomento: CAPES, CNPq e FAPEAL por toda a colaboração com as pesquisas.

Por fim, ao grande amor da minha vida, Dayse, por toda paciência, dedicação, ajuda e, principalmente, apoio nesse período tão difícil de minha vida.

"Na vida, nós devemos ter raízes, e não âncoras. Raiz alimenta, âncora imobiliza. Quem tem âncoras vive apenas a nostalgia e não a saudade. Nostalgia é uma lembrança que dói, saudade é uma lembrança que alegra"

Mario Sergio Cortella

LISTA DE FIGURAS:

Figura 1 – (A) Rizoma de <i>Curcuma longa</i> ; (B) pó seco e moído extraído de rizoma de <i>C. longa</i> ; (C) flor de <i>C. longa</i>	29
Figura 2 – Estruturas químicas dos fitoquímicos presentes em maior quantidade na <i>Curcuma longa</i>	31
Figura 3 – Grupos funcionais na curcumina. (A) β -dicetona ou seu tautômero ceto-enol; (B) fenol; (C) ligação dupla conjugada.	32
Figura 4 – Equilíbrio ceto-enólico da curcumina (A) e reações de transferência de prótons, com respectivos valores de pKa (B).	33
Figura 5 – Rotas de degradação química da curcumina: (A) Solvólise da curcumina (1) levando a vários subprodutos da fragmentação, com geração de: vanilina (2), ácido ferúlico (3) e feruloilmetano (4), em pH alcalino; (B) Autoxidação da curcumina em meio tamponado, com formação da biclopentadienona (7), que é o principal produto de degradação em meio aquoso; (C) Fotodegradação que pode ocorrer quando a curcumina está na forma cristalina e é dissolvida em solvente orgânico, com subprodutos: vanilina (2), ácido ferúlico (3), aldeído ferúlico (5) e ácido vanílico (6); (D) Fotodegradação da curcumina em certos solventes orgânicos (como isopropanol), com formação de um derivado gliacol (8).	35
Figura 6 – Esquema da degradação da curcumina durante a torrefação a 180°C e correspondente formação de produtos de degradação selecionados.	36
Figura 7 – Metabolismo da curcumina quando administrada por via intravenosa, ou intraperitoneal, ou oral e suas respectivas enzimas catalizadoras.	38
Figura 8 – Mecanismo antioxidante da curcumina, envolvendo a doação de hidrogênio radicalar pelo fenol (A) e estabilização do radical formado, por ressonância no anel aromático (B).	41
Figura 9 – Mecanismo antioxidante da curcumina, envolvendo a doação de hidrogênio radicalar no metileno (A) e estabilização do radical formado (B).	41
Figura 10 – Mecanismo proposto para a eliminação de HOCl pela curcumina.	42
Figura 11 – Mecanismo de atividade de eliminação de ânion radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), do complexo curcumina-cobre (Cu^{2+}), em (A) complexo com cobre, e em (B) fenólica.	43
Figura 12 – Alvos moleculares modulados pela curcumina.	62
Figura 13 – Evolução do processo metodológico.	63
Figura 14 – Fluxograma da fase experimental <i>in vivo</i> – Animais saudáveis (Fase G1).	67
Figura 15 – Fluxograma da fase experimental <i>in vivo</i> – Animais com colite ulcerativa moderada induzida por sulfato de sódio dextrana (SSD a 3% - p/v) (Fase G2).	69
Figura 16 – Reação entre o ânion radical superóxido e o WST-1, formando o WST-1 formazan.	73
Figura 17 – Reação entre o H_2O_2 e o vermelho de fenol.	75

Figura 18 – Reação entre o peróxido de hidrogênio e a <i>orto</i> -dianisidina.	76
Figura 19 – Espectros de absorção no UV-Vis dos extratos de <i>Curcuma longa</i> e da curcumina.	80
Figura 20 – Cromatograma dos curcuminóides padrões: (A) bisdesmetoxicurcumina, (B) desmetoxicurcumina e (C) curcumina, em 425 nm.	81
Figura 21 – Cromatograma do extrato fração metanólica de <i>Curcuma longa</i> (CM). Picos correspondem a: 1, bisdesmetoxicurcumina; 2, desmetoxicurcumina; 3, curcumina, em 425 nm.	82
Figura 22 – Cromatograma do extrato fração hexânica/metanólica de <i>Curcuma longa</i> (CHM). Os picos correspondem a: 1, bisdesmetoxicurcumina; 2, desmetoxicurcumina; 3, curcumina, em 425 nm.	82
Figura 23 – Cromatograma do extrato fração hexânica de <i>Curcuma longa</i> (CH). Picos correspondente a: 2 desmetoxicurcumina; 3 curcumina, em 425 nm.	83
Figura 24 – Cromatograma do extrato fração etanólica de <i>Curcuma longa</i> (CE). Picos correspondem a :1 bisdesmetoxicurcumina; 2 desmetoxicurcumina; 3 curcumina, em 425 nm.	83
Figura 25 – Cromatograma CLAE-UV do extrato farmacêutico de <i>Curcuma Longa</i> (ExtFarC). Pico corresponde: 3 curcumina, em 425 nm.	84
Figura 26 – Peso corporal (A e B), ganho de peso (C) e ingestão semanal de ração (D) dos animais saudáveis (n= 5), fase G1 de acordo com grupo e o período de tratamento.	86
Figura 27– Glicemia de jejum dos animais saudáveis (n= 5), fase G1 de acordo com grupo e o período de tratamento.	87
Figura 28 – Marcadores redox colônicos, segundo o grupo de tratamento: controle (C); extrato farmacêutico de curcuma (Ext); e pó de curcuma (Pó), fase G1, (n= 5).	89
Figura 29 – Marcadores redox hepáticos segundo o grupo de tratamento: controle (C); extrato farmacêutico de curcuma (Ext); e pó de curcuma (Pó); fase G, (n= 5).	90
Figura 30 – Marcadores redox cardíacos, segundo o grupo de tratamento: controle (C); extrato farmacêutico de curcuma (Ext); e pó de curcuma (Pó); fase G1, (n= 5).	91
Figura 31 – Marcadores redox cerebral, segundo o grupo de tratamento: controle (C); extrato farmacêutico de curcuma (Ext); e pó de curcuma (Pó), fase G1, (n= 5).	93
Figura 32 – Avaliação histológica colônica através da coloração com hematoxilina e eosina dos grupos: controle (C) (A), colite moderada (CM) (B) (colite moderada induzida por sulfato de sódio dextrana – SSD 3%), e colite moderada tratado com extrato de <i>Curcuma longa</i> (Ext_M) (C): aumento de 50x – A1, B1 e C1; e aumento de 100x – A2, B2, C2).	96
Figura 33 – Peso corporal (A e B), ganho de peso (C) e ingestão semanal (D) dos animais de acordo com grupo e o período de tratamento, fase G2.	97
Figura 34 – Glicemia de jejum dos animais da fase G2 de acordo com grupo e o período de tratamento.	99
Figura 35 – Perfil inflamatório colônico, segundo os grupos de tratamento: controle (C), colite moderada (CM) (colite moderada induzida por sulfato de	

sódio dextrana – SSD 3%), e colite moderada tratado com extrato de <i>Curcuma longa</i> (Ext_M).....	101
Figura 36 – Perfil inflamatório hepático, segundo o grupo de tratamento: controle (C), colite moderada (CM) (colite moderada induzida por sulfato de sódio dextrana – SSD 3%), e colite moderada tratado com extrato de <i>Curcuma longa</i> (Ext_M), fase G2, (n= 6).	103
Figura 37 – Perfil inflamatório cardíaco, segundo o grupo de tratamento: controle (C), colite moderada (CM) (colite moderada induzida por sulfato de sódio dextrana – SSD 3%), e colite moderada tratado com extrato de <i>Curcuma longa</i> (Ext_M), fase G2, (n= 6).	105
Figura 38 – Perfil inflamatório cerebral, segundo o grupo de tratamento: controle (C), colite moderada (CM) (colite moderada induzida por sulfato de sódio dextrana – SSD 3%), e colite moderada tratado com extrato de <i>Curcuma longa</i> (Ext_M), fase G2, (n= 6).	107
Figura 39 – Marcadores redox no colón, segundo o grupo de tratamento: controle (C), colite moderada (CM) (colite moderada induzida por sulfato de sódio dextrana – SSD 3%), e colite moderada tratado com extrato de <i>Curcuma longa</i> (Ext_M), fase G2, (n= 6).	110
Figura 40 – Marcadores redox no tecido hepático, segundo o grupo de tratamento: controle (C), colite moderada (CM) (colite moderada induzida por sulfato de sódio dextrana – SSD 3%), e colite moderada tratado com extrato de <i>Curcuma longa</i> (Ext_M), fase G2, (n= 6).....	112
Figura 41 – Marcadores redox no tecido cardíaco, segundo o grupo de tratamento: controle (C), colite moderada (CM) (colite moderada induzida por sulfato de sódio dextrana – SSD 3%), e colite moderada tratado com extrato de <i>Curcuma longa</i> (Ext_M), fase G2, (n= 6).....	114
Figura 42 – Marcadores redox no tecido cerebral, segundo o grupo de tratamento: controle (C), colite moderada (CM) (colite moderada induzida por sulfato de sódio dextrana – SSD 3%), e colite moderada tratado com extrato de <i>Curcuma longa</i> (Ext_M), fase G2, (n= 6).....	116

LISTA DE QUADROS:

Quadro 1 – Efeitos da curcumina em situações clínicas, em diversos sistemas do organismo.....	44
Quadro 2 – Efeitos da curcumina em situações clínicas, relacionados aos sistemas digestório e hepatobiliar.	53
Quadro 3 – Composição das dietas experimentais baseadas na dieta AIN-93M ¹	70
Quadro 4 – Quantificação dos extratos de <i>C. longa</i> por CLAE, com detecção a 425nm.....	85

LISTA DE ABREVIATURAS:

ΔT	Variação de temperatura
5-ASA	Ácido 5-aminossalicílico
5LOX	5-lipoxigenase
AAPK	Grupo quinase Atípico
AAPK	Grupo quinase Atípico
ABS	Albumina sérica bovina
AGL	Ácido graxo livre
AHR	Receptor de hidrocarbonetos arílicos
AIN	<i>American institute of nutrition</i>
Anti-TNF α	Anti- Fator de necrose tumoral
AP-1	Proteína ativadora 1
ATB	Ácido tiobarbitúrico
ATPase	Adenosinatrifosfatases
AUC 0- ∞	Área sobre a curva de 0 ao infinito
Bcl-2	Linfoma de células B 2
Bcl-XL	Linfoma de células B extragrande
BDNF	Fator neurotrófico derivado do cérebro
BHT	Butil-hidroxitolueno
Ca ²⁺ PK	Fosfoquinase Ca ²⁺
Caco-2	Células de adenocarcinoma epitelial colorretal humano heterogêneo

CD8(+)	<i>Cluster</i> de diferenciação 8
CE	Curcuma, extrato etanólico
CEP	Colangite esclerosante primária
CHM	Curcuma, fração hexanometanólica
CII-TA	Cromatina transativador classe II
Citocina th1	Ativador de macrófagos e participa na geração de células Tc
Citocina th2	Ajuda a ativar células B
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CM	Curcuma, extrato metanólico
Cmax	Concentração máxima
ConA	Concanavalina A
COX-2	Ciclooxigenase-2
CREBBP	C- proteína de ligação ao estimulador b
CUI	Colite ulcerativa idiopática
CXC4R	Receptor de quimiocina C-X-C tipo 4
Cyclin D1	Proteína que em humanos é codificada pelo gene CCND1
DAO	Diamina oxidase
DC	Doença de Crohn
DHZ	Deidrozingerona
DII	Doença inflamatória intestinal
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DNCB	Dinitroclorobenzeno

DNPH	2,4-dinitrofenilidrazina
DR	Receptor de morte
DTNB	Ácido 5,5'-bisditionitro-2-nitrobenzóico
ECA	Enzima conversora de angiotensina
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EGF	Fator de Crescimento Fibroblástico
EGFR	Expressão do <i>receptor</i> do fator de crescimento epitelial
EGFR-K	Receptor de fator de crescimento epidérmico
EGR-1	Fator de crescimento da epiderme-1
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial
EO	Estresse Oxidativo
EPCR	Complexo endotelial receptor proteína C
ERK	Quinases reguladas pelo sinal extracelular
ERONs	Espécies reativas de oxigênio e nitrogênio
ER α	Receptor de estrogênio alfa
ExtFarC	Extrato farmacêutico de curcumina
FAK	Quinase de adesão focal
FANUT	Faculdade de Nutrição
FDA	Administração de comidas e medicamentos
FGF	Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas
FGF-2	Fator de crescimento de fibroblastos 2
FN1	Fibronectina 1

FOXP3	Família de proteínas FOX 3
FPT	ferroportina
GCL	Ligasa glutamato-cisteína
GCS	Geralmente considerado seguro
GR	Glutaciona redutase
GSH	Glutaciona reduzida
GST	Glutaciona-S-transferase
HE	Hematoxilina e eosina
HER2	Fator de crescimento epidérmico humano Receptor-tipo 2
HGF	Fator de crescimento de hepatócito
HIF-1	Fator Induzível por Hipóxia1
HO•	Radical hidroxila
HPA	Hipotálamo-pituitária-adrenal
Hsp-70	Proteínas de choque térmico de 70 quilo Dalton
HUPAA	Hospital Universitário Professor Alberto Antunes
IAD	Índice de atividade da doença
IADC	Índice de atividade da doença de Crohn
ICAM-1	Molécula de adesão intercelular -1
IL-1Rak	Gene da quinase associado ao receptor da interleucina-1
IL8R	Receptor de interleucina 8
iNOS	Óxido nítrico sintase induzida
INT-Y	Interferon gama

IV	Infravermelho
JAK	Janus quinases
JNK	cJun N-terminal quinase
KU	Mil unidades
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LDLR	O receptor de lipoproteína de baixa densidade
LPL	Lipoproteína lipase
LPS	Lipopolissacarídeo
MAP quinase1	Proteína quinase fosfatase -1
MAPK	Proteína-quinases ativadas por mitógeno
MAPKp38	Proteínas quinases ativadas por mitógeno 38
MCP	Proteína Químioatraente de Monócitos
MDA	Malondialdeído
MHC-II	Complexo principal de histocompatibilidade II
MIP	Média do IP de todos os sítios de todos os dentes
MMP	Metaloproteínase matriz
MPO	Mieloperoxidase
MyD88	Fator de diferenciação mielóide 88
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida
NADPH	Fosfato de nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida
NEM	<i>N</i> -etilmaleimida

NF-kappa Bp65	Fator nuclear kappa B p65 Proteínas
NFKappa-β	Fator nuclear kappa B
NK	Natural <i>killer</i>
NO	Óxido nítrico
Notch-1	Proteína homóloga neurocirúrgica do locus 1
NQO1	Quinona oxidoreductase 1
Nrf2	Fator de transcrição nuclear
ODC	Ornitina decarboxilase
p38 MAPK	p38 proteína quinase ativada por mitógeno
p53	Proteína citoplasmática, de massa molecular 53 kDa.
PAK	Serina / treonina-proteína quinase
PAR	Receptores Ativados por Proteases
PARY	Receptor nuclear peroxissomo ativado por proliferador GAMMA
pCREB	Fosforilação da proteína de ligação ao elemento de resposta cAMP
PDGF	Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas
pH	Potencial hidrogeniônico
Phex	Gene regulador de fosfato com homologias para endopeptidases no cromossomo X
PhK	Fosforilase quinase
PI3K	Fosfatidilinositideo 3-quinase
pKa	Log da constante de acidez

PKA	Proteína quinase A
PKB	Proteína quinase B
PL	Peroxidação lipídica
PMN	Polimorfonucleares
Pp60C-TK	Tirosina quinase Pp60C
PPAR-Y	Receptor ativado por proliferadores de peroxissoma gama
PRL-3	Fosfatase de regeneração do fígado 3
PTK	Proteína-tirosina-quinases
PTn	Proteína
pTRPV1	Potencial do receptor transitório fosforilado vanilóide 1
QRE	Quinase regulada por sinal
RI	receptor de insulina
RIPA	Tampão do ensaio de radioimunoprecipitação
RNAm	Ácido ribonucleico mensageiro
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SNC	Sistema nervoso central
SOCS	Supressores da sinalização de citocinas
SOD	Superóxido dismutase
Src-2	domínios homólogos 2
SSD	Sulfato de sódio dextrana
STAT	Transdução e ativação da transcrição
STZ	Estreptozotocina

TBA	Acido tiobarbitúrico
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TCA	Ácido tricloroacético
TGF- β 1	Fator de crescimento transformador beta 1
TIMP-1	Inibidor de metalopeptidase 1
TLR4	Receptor <i>toll-like</i> 4
Tmax	Temperatura máxima
TMP	1,1,3,3-Tetrametoxipropano
TNFSF12	Membro da superfamília do fator de necrose tumoral 12 (ligante)
TNF α	Fator de necrose tumoral alfa
TRPV1	Potencial do receptor transitório vanilóide 1
UNESCO	Organização das nações unidas para a educação, a ciência e a cultura
Upa	Ativador do plasminogênio tipo uroquinase
UV	Ultravioleta
VCAM-1	Proteína de adesão vascular 1
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
VLDL	Lipoproteína de densidade muito baixa
WST	<i>Water-soluble tetrazolium salt</i>
WT-1	Produto de gene supressor de tumor 1;
β -catenin	Catenina- β
λ_{\max}	Comprimento de onda máximo

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	24
2 OBJETIVO GERAL	27
2.1 Objetivos Específicos	27
3 REVISÃO DE LITERATURA	28
3.1 plantas medicinais	28
3.2 Curcuma longa (C. longa)	28
3.3 Composições da <i>Curcuma longa</i>	30
3.4 A química de curcuminóides	31
3.5 Metabolismo dos curcuminóides	37
3.6 Farmacocinética da curcumina	38
3.7 Atividades biológicas de curcuminóides	40
3.8 Toxicidade em modelos animais	49
3.9 Doenças inflamatórias intestinais (DII) e curcumina	50
3.10 Justificativa	63
4 MATERIAIS E MÉTODOS	64
4.1 Materiais	64
4.1.1 Reagentes	64
4.1.2 Equipamentos	65
4.1.3 Preparação dos extratos do pó de <i>Curcuma longa</i>	65
4.2 Métodos	66
4.2.1 – Fase experimental <i>in vivo</i> – Animais Saudáveis (Fase G1) e animais induzidos à colite ulcerativa moderada (Fase G2).....	66
4.2.2 Estimativa da ingestão alimentar	70
4.2.3 Glicemia de jejum	71
4.2.4 Eutanásia e coleta dos órgãos.....	71
4.2.5 Preparação dos extratos teciduais	71
4.3 Análise histológica	72
4.4 Análises bioquímicas	72
4.4.1 Dosagem de proteínas teciduais para as duas fases G1 e G2.....	72
4.4.2 Determinação dos marcadores de capacidade antioxidante fases G1 e G2	73
4.4.3 - Superóxido dismutase (SOD)	73
4.4.4 - Catalase (CAT), fases G1 e G2.....	73

4.4.5 - Determinação dos níveis de glutathiona reduzida (GSH) e glutathiona oxidada (GSSG), fases G1 e G2	74
4.4.6 Avaliação da produção de espécies pró-oxidantes para as fases G1 e G2	75
4.4.6.1 - Peróxido de Hidrogênio (H ₂ O ₂)	75
4.5.1 Determinação dos níveis do fator de necrose tumoral alfa, interferon gama e interleucina 6 e 10	76
4.5.2 - Mieloperoxidase (MPO)	76
4.6 Determinação de marcador de dano oxidativo para as fases G1 e G2	77
4.6.1- Malondialdeído (MDA)	77
4.7 Análise estatística	77
4.8 Submissão do projeto	78
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	79
5.2 Avaliação da biometria e dosagem glicêmica	85
6 CONCLUSÃO DA FASE G1	94
7 RESULTADOS FASE G2	95
7.1 Análise histológica colônica	95
7.2 Avaliação da do peso corporal, ganho de peso, ingestão semanal da dieta e dosagem glicêmica	97
7.3 Perfil inflamatório tecidual dos animais segundo as citocinas: TNF- α , INF- γ , IL-6, e IL-10 e a enzima MPO.....	101
7.5 Perfil oxidativo obtido a partir da análise de dano oxidativo (MDA), produção de espécie pró-oxidante (H ₂ O ₂) e de defesa antioxidante enzimática (SOD e CAT), e não enzimática (GSH, GSSG e Razão GSH/GSSG).....	109
8 CONCLUSÃO DA FASE 2.....	118
9 PERSPECTIVAS FUTURAS.....	120
10 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	121
11 ANEXOS	142

Araújo O. R. P. 2019. Este trabalho teve por objetivo avaliar os efeitos sobre o equilíbrio redox e a inflamação, da administração oral de extrato de *Curcuma longa*, em diferentes tecidos de camundongos com colite ulcerativa moderada induzida por sulfato de sódio dextrana (3% de SSD na água de beber). Inicialmente foram realizadas a identificação e a quantificação dos curcuminóides dos diversos tipos de extratos da *Curcuma longa* (metanólico, etanólico, farmacêutico, hexânico, hexanometanólico). Os extratos metanólico, hexanometanólico e etanólico apresentaram os 3 curcuminóides característicos da *C. longa* (bisdesmetoxicurcumina, desmetoxicurcumina e curcumina), enquanto no extrato farmacêutico, comercialmente disponível, a curcumina constituía o produto majoritário (>95%). Em seguida, o trabalho foi dividido em 2 partes, sendo a primeira (G1), realizada em animais saudáveis, tendo como objetivo avaliar qual forma de *Curcuma* (extrato ou pó) apresentaria melhor atividade antioxidante/anti-inflamatória e a segunda (G2), visando avaliar os efeitos da *Curcuma* (extrato farmacêutico) em animais com colite ulcerativa moderada. Para análise estatística em ambos os casos, avaliou-se a normalidade dos dados pelo teste de Komogorov-Smirnoff e, em seguida, foi realizada a comparação entre os grupos, de acordo com a distribuição normal e não normal, sendo assumida a significância de 5%. Em G1, 15 camundongos machos *Swiss*, com 8 semanas de nascidos, foram randomizados em 3 grupos: Controle (C), que receberam ração comercial; *Curcuma* extrato (Ext), que receberam 250 mg/kg de peso/dia de *Curcuma* na forma de extrato farmacêutico; e *Curcuma* pó (Pó), que receberam 1g/kg de peso por dia de *Curcuma* na forma de pó, ambas as administrações foram confeccionadas com a ração comercial. O período experimental *in vivo* durou 30 dias. Foram avaliados o crescimento e a glicemia desses animais, também foram avaliados os níveis de malondialdeído (MDA) e peróxido de hidrogênio (H₂O₂), e as atividades das enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e mieloperoxidase (MPO), nos tecidos intestinal, hepático, cardíaco e cerebral. Na fase G1 do trabalho, não foram observadas diferenças de crescimento e glicemia entre os grupos. Por outro lado, foram identificadas melhoras significativas entre animais que receberam o extrato farmacêutico, com diminuição nos níveis de MDA cerebral, em comparação ao grupo controle (p <0,001), e de diminuição de H₂O₂, em comparação à *Curcuma* ofertada em pó (p <0,005). Na fase G2, 18 camundongos machos *Swiss*, com 8 semanas de nascidos, foram randomizados em 3 grupos: controle (C) – ração comercial; colite moderada (CM) – animais com CUI moderada + ração comercial; e extrato moderado (Ext_M) – animais com CUI moderada + 250 mg/kg de peso/dia de *Curcuma* (extrato farmacêutico) confeccionada em conjunto com a ração comercial. A suplementação oral de *Curcuma* ocorreu por 37 dias e a indução da CUI foi realizada nos últimos 7 dias de experimento. Além do perfil oxidativo (MDA, H₂O₂, CAT, SOD, GSH, GSSG e a razão GSH/GSSG); o perfil inflamatório (TNF- α , IL-6 e 10 e INF- γ) dos tecidos intestinal, hepático, cardíaco e cerebral; avaliaram-se também os aspectos histológicos no tecido intestinal. A CUI foi induzida com sucesso, o intestino apresentou diminuição nas citocinas pro-inflamatórias INF (p <0,05), IL-6 (p <0,05) e TNF (p <0,05), na atividade redox um aumento na razão GSH/GSSG (p <0,01) e diminuição da CAT (p <0,01), no tecido hepático houve uma diminuição de TNF (p <0,05), e IL-10 (p <0,05), na atividade redox um aumento na CAT (p <0,0001), GSH/GSSG (p <0,0001) e MDA (p <0,0001), no tecido cardíaco houve uma diminuição da atividade anti-inflamatória na IL-10 (p <0,05), um aumento CAT (p <0,0001), MDA (p <0,05) e GSSG (p <0,01), no tecido cérebro um aumento do INF (p <0,001) e IL-10 (p <0,05) no perfil redox um aumento da SOD (p <0,001), e CAT (p <0,01), GSH/GSSG (p <0,01) e diminuição na GSSG (p <0,0001), esses dados em conjuntos levam a diversos questionamentos do uso da *Curcuma* como um antioxidante/anti-inflamatório natural no tratamento da colite ulcerativa no que diz respeito as manifestações extra-intestinais haja vista que esses dados demonstraram alterações importantes nos marcadores com a administração do (Ext_M) em animais acometidos por CUI, com acréscimos em marcadores pro-inflamatórios e pró-oxidantes importantes nos tecidos extra-intestinais estudados. Por fim esses dados em conjunto confirmam a necessidade de uma avaliação órgão-ampliada.

Palavras-chave: *Curcuma longa*, estresse oxidativo, MDA, citocinas, colite ulcerativa, interleucinas, extrato farmacêutico de *Curcuma*.

Araújo O. R. P. 2018. This study aimed to evaluate the effects on the redox and inflammation balance of oral consumption of *Curcuma longa* extract in different tissues of mice with moderate idiopathic ulcerative colitis (IUC) induced by sodium dextran sulfate (3% SSD in water to drink). Initially, the curcuminoids of the various types of *Curcuma longa* extracts (methanolic, ethanolic, pharmaceutical, hexane, hexanemethanolic) were identified and quantified. The methanolic, hexanemethanolic and ethanolic extracts presented the 3 curcuminoids characteristic of *C. longa* (bisdemethoxycurcumin, demethoxycurcumin and curcumin), whereas in the pharmaceutical extract, commercially available, curcumin constituted the major product (> 95%). Then, the work was divided in 2 parts, the first one (G1) was carried out in healthy animals, with the objective of evaluating which form of *Curcuma* (extract or powder) would present better antioxidant / anti-inflammatory activity and the second one (G2), aiming to evaluate the effects of *Curcuma* (pharmaceutical extract) in animals with moderate ulcerative colitis. For statistical analysis in both cases, the normality of the data was evaluated by the Komogorov-Smirnoff test and then the comparison between the groups was performed according to the normal / non-normal distribution, assuming a significance of 5 %. In G1, 15 Swiss male mice, 8 weeks old, were randomized into three groups: Control (C), which received commercial ration; *Curcuma* extract (Ext), which received 250 mg/kg by weight/day of *Curcuma* as pharmaceutical extract; and *Curcuma* powder (Powder), which received 1g / kg of body weight per day of *Curcuma* in the form of powder, both administrations were made with the commercial ration. The *in vivo* experimental period lasted 30 days. The growth and glycemia of those animals were evaluated. Also were measured the levels of malondialdehyde (MDA), hydrogen peroxide (H₂O₂), the activities of the superoxide dismutase enzymes (SOD), catalase (CAT) and myeloperoxidase (MPO) in the intestinal, hepatic, cardiac and cerebral tissues. In phase G1 of the study, no growth and glycemia differences were observed between groups. On the other hand, significant improvements were identified among animals that received the pharmaceutical extract, with a decrease in brain MDA levels, compared to the control group (p <0.001), and decrease of H₂O₂, compared to powdered *Curcuma* (p <0.005). In phase G2, 18 Swiss male mice, 8 weeks old, were randomized into three groups: control (C) - commercial ration; moderate colitis (MC) - animals with moderate IUC + commercial ration; and moderate extract (ExM) - animals with moderate IUC + 250 mg/kg of body weight/day of *Curcuma* (pharmaceutical extract) prepared with commercial ration. Oral curcuma supplementation occurred for 37 days and IUC induction was performed in the last 7 days of the experiment. In addition to the oxidative profile (MDA, H₂O₂, CAT, SOD, GSH, GSSG and GSH/GSSG ratio); the inflammatory profile (TNF- α , IL-6 e 10 e INF- γ) of intestinal, hepatic, cardiac and brain tissues; it were also evaluated histological aspects in intestinal tissues. IUC was successfully induced. The intestine showed a decrease in the proinflammatory cytokines INF (p <0.05), IL-6 (p <0.05) and TNF (p <0.05), in the redox activity there was increase in the GSH / GSSG ratio <0.01) and decrease in CAT (p <0.01). In the hepatic tissue there was a decrease in TNF (p <0.05), and IL-10 (p <0.05), in the redox activity an increase in CAT (p <0.0001), GSH / GSSG (p <0.0001) and MDA (p <0.0001). In the cardiac tissue there was a decrease in the anti-inflammatory activity in IL-10 (p <0.05), a CAT increase (p <0.0001), MDA (p <0.05) and GSSG (p <0.01). In the brain tissue an increase in INF (p <0,001) and IL-10 (p <0,05) in the redox profile an increase of SOD (p <0,001) and CAT (p <0,01), GSH/GSSG (p <0,01) and decrease of GSSG (p <0,0001). These data together lead to a number of questions regarding the use of *Curcuma* as a natural anti-inflammatory / anti-inflammatory drug in the treatment of ulcerative colitis with regard to extra-intestinal manifestations seeing that these data have shown important imbalance in the markers with (Ext_M) administration in animals affected by IUC, with increases in important pro-inflammatory and pro-oxidants markers in the extra-intestinal tissues studied. Finally, these data together confirm the need for a body-wide evaluation.

Key words: *Curcuma longa*, oxidative stress, MDA, cytokines, ulcerative colitis, interleukins, *Curcuma* pharmaceutical extract.

1 INTRODUÇÃO

A colite ulcerativa idiopática (CUI) é uma forma de doença inflamatória intestinal (DII) caracterizada como remitente e de progressão crônica que acomete o intestino grosso. Apesar da etiologia para a CUI ainda ser desconhecida, acredita-se que múltiplos fatores contribuem para o seu surgimento, dentre eles destacam-se a genética associada a alterações imunológicas e ambientais. Na CUI, o corpo pode secretar mediadores inflamatórios e gerar espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (ERONs), o que resulta em perda da integridade da barreira epitelial e agravamento da resposta inflamatória da mucosa (KONDAMUDI et al., 2015; ZHAO et al., 2016). Nos últimos anos, a incidência de CUI aumentou progressivamente, alcançando níveis de 0,0243% na Europa e América e de 0,0192% na Ásia e no Oriente Médio (ZENG et al., 2013). A prevalência e a incidência das DII vêm aumentando em todo o mundo, em especial nos países em desenvolvimento (BERNSTEIN et al., 2015).

No Brasil, ainda não há dados epidemiológicos sobre a prevalência e incidência gerais da CUI, apenas estudos pontuais em alguns estados, como Mato Grosso (DE SOUZA et al., 2011; DE SOUZA; BELASCO; DE AGUILAR-NASCIMENTO, 2008), São Paulo, Minas Gerais (DA CRUZ et al., 2007), Pernambuco e Alagoas (BARROS, 2014; DE BARROS; DA SILVA; LINS NETO, 2014).

A terapia convencional das DII envolve o uso de sulfassalazina, corticoides, agentes imunossupressores, como a azatiopina, além de terapia biológica, representada pelo anticorpo anti-TNF α (anti-fator de necrose tumoral alfa), usados para o controle da resposta imune e da inflamação (RUTGEERTS; VERMEIRE; VAN ASSCHE, 2009). No entanto, a aplicação a longo prazo de fármacos sintéticos, como o ácido 5-aminossalicílico (5-ASA) e agentes imunossupressores, pode produzir muitas complicações graves e efeitos colaterais tóxicos, como aumento da suscetibilidade à infecção, bem como a redução na resposta autoimune. Diante disso, terapias alternativas vêm sendo utilizadas para uma melhora na qualidade de vida do paciente acometido por essa enfermidade (ZHAO et al., 2017).

A investigação de antioxidantes polifenólicos, que venham a desempenhar papel fundamental no tratamento da CUI é de profundo interesse e empenho da comunidade científica, haja vista seu anseio em aumentar a qualidade de vida dos

pacientes, diminuindo assim os efeitos colaterais oriundos do tratamento convencional medicamentoso.

Entre os antioxidantes mais conhecidos, a curcumina (1,7-bis (4-hidroxi-3-metoxifenil)-1,6-heptadieno-3,5-diona) é um polifenol lipossolúvel com uma característica cor amarela, proveniente da *Curcuma longa*, um arbusto perene endêmico da Índia, da família Zingiberaceae. Há registros de seu uso desde o século I, embora haja referências à planta em manuscritos gregos do século IV (SUETH-SANTIAGO et al., 2015).

A curcumina exibe efeitos positivos para a saúde humana por meio de atividades antioxidante, antimicrobiana, anti-inflamatória, antifúngica, hipoglicemiante, cicatrizante, antiproliferativa e anticarcinogênica, interagindo com vários fatores de transcrição gênica, enzimas, citocinas inflamatórias, proteínas, fatores de crescimento e receptores. O polifenol é isolado a partir da raiz da *Curcuma longa*, um membro da família do gengibre (OHNO et al., 2017; QURESHI et al., 2017). A segurança e a tolerabilidade da curcumina foram confirmadas por ensaios clínicos em seres humanos e em cobaias para o tratamento de vários distúrbios inflamatórios. No entanto, a principal limitação do seu uso clínico está associada à baixa biodisponibilidade oral, devido à má absorção no intestino. A curcumina é altamente hidrofóbica, com solubilidade em soluções aquosas de apenas 0,456 µg / mL e alta taxa de metabolismo, o que resulta em tempo de meia-vida curto (OHNO et al., 2017; XIAO et al., 2016).

Para uma melhor avaliação do estado redox da *C longa* foi empregado a avaliação de um conjunto de marcadores do estresse oxidativo como medida da atividade das enzimas CAT e SOD, avaliação de marcadores de dano como MDA e H₂O₂. Abaixo serão descritos alguns aspectos importantes sobre esses biomarcadores.

O malondialdeído (MDA), um dieno conjugado, é um dos biomarcadores mais utilizados por ser um dos produtos de peroxidação lipídica mais conhecidos. Possui ação citotóxica e genotóxica, encontrando-se em níveis elevados em algumas patologias associadas ao estresse oxidativo (GROTTO et al., 2008).

O H₂O₂, apesar de ser uma espécie pouco reativa, é capaz de inativar enzimas, principalmente pelas oxidações de grupos tióis essenciais. Seu maior potencial

oxidante é exercido, entretanto, pela forma indireta, por meio da geração do radical HO•, produzido via reação de Fenton. O peróxido de hidrogênio, nestas condições, torna-se um bom oxidante, pois em concentrações adequadas e combinado ao ferro pode aumentar sua toxicidade de 10 até 100 vezes, desta forma, sendo prejudicial às estruturas celulares (SCHNEIDER; CUERVO, 2013).

A superóxido dismutase (SOD) pertence ao primeiro nível antioxidante de defesa. É encontrada sob 3 formas, a Cu/ZnSOD ou SOD1, que está localizada no citosol, núcleo e espaço entre as membranas interna e externa da mitocôndria (tetramérica); a MnSOD ou SOD2, que está localizada na matriz mitocondrial; e a SOD 3, ou SOD extracelular (Cu-Zn) (SURAI, 2016).

A catalase (CAT), cujo sítio ativo contém o grupo heme, atua, principalmente, enclausurada no peroxissoma, a principal organela responsável pela desintoxicação celular e pela oxidação de ácidos graxos de cadeia longa, fonte inesgotável de peróxidos orgânicos, produtos carbonílicos e oxigênio singlete (DE MORAES et al., 2014). Essa enzima converte o H₂O₂ em água, evitando assim, sua conversão ao radical hidroxila.

Ensaio clínico mostraram que, apesar de sua baixa biodisponibilidade, a curcumina é bem aceita em doses de até 12 g / dia, por 3 meses, em humanos, sem efeitos colaterais clinicamente significativos. Como resultado, a curcumina foi reconhecida como um composto “geralmente considerado seguro” (GCS) pela *Food and Drug Administration* (FDA) dos EUA (YILDIRIM et al., 2016).

Desta forma, a presente tese tem como objetivo estudar os efeitos da *Curcuma longa*, na sua melhor formulação, determinada na fase G1, no tratamento sistêmico da colite ulcerativa, fase G2, com avaliação de sua ação sobre marcadores do estresse oxidativo e de inflamação, em camundongos com colite ulcerativa moderada, induzida por sulfato de sódio dextrana (DSS).

2 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito do consumo oral de *Curcuma longa* sobre marcadores do perfil redox e inflamatório em diferentes tecidos de camundongos saudáveis e/ou com colite ulcerativa moderada, induzida por sulfato de sódio dextrana.

2.1 Objetivos Específicos

- ✓ Determinar o perfil de curcuminóides presentes no extrato/pó da *Curcuma longa*;
- ✓ Avaliar o efeito da ingestão e da glicemia dos animais submetidos as dietas enriquecidas de extrato farmacêutico (forma concentrada) e pó (forma natural) da *Curcuma longa*, sobre marcadores do perfil redox nos tecidos intestinal, hepático, cardíaco e cerebral de camundongos saudáveis ingestão de camundongos saudáveis;
- ✓ Determinar qual formulação rica em curcuminóides (extrato ou pó) apresenta melhor ação sobre a capacidade redox nos tecidos intestinal, hepático, cardíaco e cerebral de camundongos saudáveis, determinar alterações histológicas no tecido colônico dos animais com colite moderada, com e sem suplementação do extrato farmacêutico de *Curcuma longa*.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Plantas medicinais

A utilização de plantas medicinais por parte da população é milenar e continua despertando o interesse de muitos pesquisadores, com o objetivo de conhecer novas moléculas que possam ser usadas na terapêutica de diversas patologias e condições clínicas (FOGLIO, et al. 2006; COMPAGNONI, M; MARIA, T; GARLET, B., 2016). Pesquisas envolvendo plantas medicinais costumam relacionar as informações adquiridas em comunidades que fazem uso da diversidade vegetal local, com estudos químicos e/ou farmacológicos (LIMA et al., 2013). Atualmente uma atividade que vem sendo investigada é o potencial existente nas plantas no que diz respeito à atividade antioxidante em extratos e/ou substâncias isoladas de produtos vegetais. Os antioxidantes naturais estão presentes em frutos, sementes, folhas e raízes de plantas e agem através de diversos mecanismos, como “sequestro” de espécies reativas de oxigênio (EROs), inibição na formação de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (ERONs), ou estímulo da defesa antioxidante enzimática e não enzimática, reduzindo, dessa forma, a circulação de ERONs, substâncias envolvidas na gênese de diversas patologias. Dentre os vários tipos de antioxidantes podem ser citados os polifenóis, constituídos de ácidos fenólicos e flavonoides, substâncias bioativas de grande ocorrência em vegetais (LIMA et al., 2013).

3.2 Curcuma longa (C. longa)

Dentre as plantas com potencial efeito biológico relacionado aos seus constituintes químicos, destaca-se à *Curcuma longa* Linn (*C. longa*), erva pertencente à classe Liliopsida e família Zingiberaceae, cultivada principalmente em regiões tropicais e subtropicais, amplamente distribuída nos trópicos da Ásia, África e Austrália, sendo a Índia seu maior produtor, consumidor e exportador (Figura 1). Seu crescimento requer um clima quente e úmido, com temperaturas entre 20 e 30 °C e grandes quantidades de água (KUNWAR; PRIYADARSINI, 2016; MCCANN et al., 2014; SINGH et al., 2012). Seu nome em latim *Curcuma*, é derivado da palavra árabe, *Kourkoum*, o nome original para o açafrão, assim conhecido popularmente. No Brasil, recebe também o nome de açafrão-da-terra (TRUJILLO et al., 2013).

Várias partes da *C. longa*, como folha, flores e rizoma, têm suas propriedades estudadas. Entretanto, a parte do vegetal mais utilizada é o rizoma (Figura 1A), que pode ser consumido fresco ou seco. Para fins de conservação, esse rizoma é descascado, desidratado e moído, gerando um pó de coloração dourada, utilizado como tempero, agente de coloração, além de ser um importante ingrediente na medicina tradicional, desde o tempo antigo, em países do sul da Ásia e do Oriente Médio (JEENGAR et al., 2017; KUMAR et al., 2016; SUETH-SANTIAGO et al., 2015).

Figura 1 – (A) Rizoma de *Curcuma longa*; (B) pó seco e moído extraído de rizoma de *C. longa*; (C) flor de *C. longa*.



Fonte: imagens cedidas pela Cooperaçafrão em (2015).

A *C. longa* pode ser usada de forma isolada ou em combinação com outros temperos como o *curry*. O pó de *curry* é uma mistura de especiarias que contém basicamente gengibre, pimenta dedo-de-moça, pimenta vermelha, canela em rama, cominho, pimenta-do-reino, cardamomo, cravo, erva-doce, coentro em grãos e açafrão, sendo o açafrão adicionado em torno de 20-30% em relação ao peso total do *curry*. Os ingredientes utilizados são torrados, moídos e usados em quantidades diferentes para preparar o *curry*, o que modifica sua constituição química. Além desses, outros ingredientes podem ser incluídos de acordo com as preferências, como alforva, pimenta-de-caiena, cominhos finos, noz-moscada, pimenta-da-jamaica, pimentão, alecrim, entre outros. Por isso, a composição pode depender de cada região/produtor, porém, a fórmula base, onde o açafrão é um dos principais ingredientes, sempre é mantida (BALIGA et al., 2012; NAMRATHA et al., 2013).

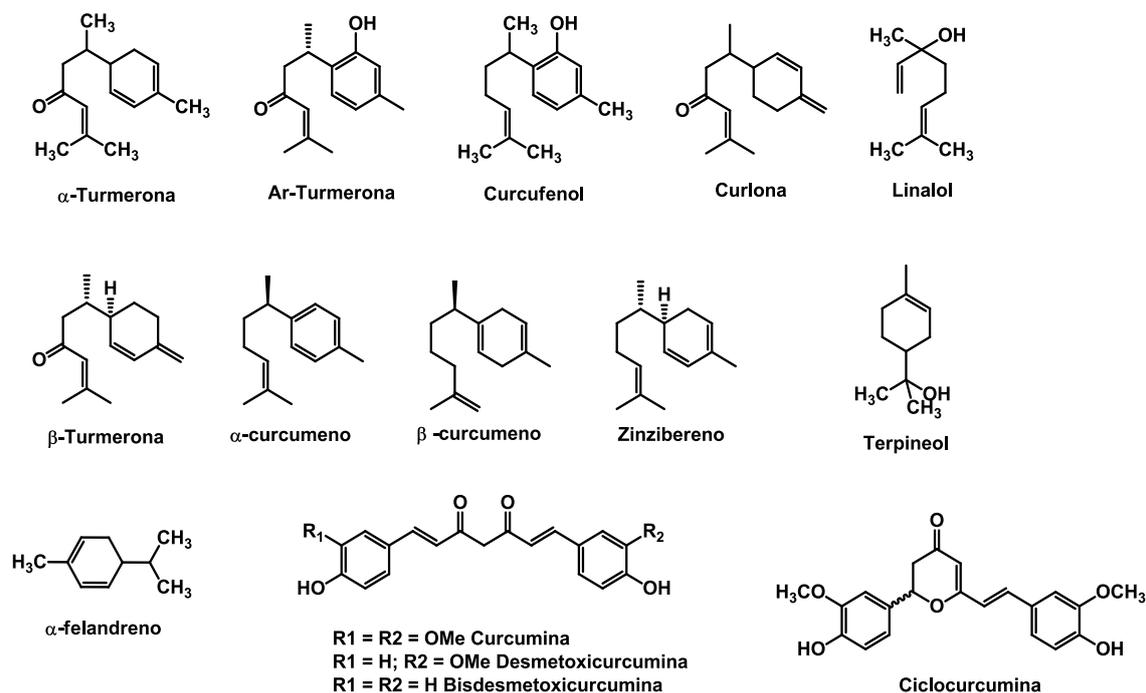
O uso do açafrão na Índia como um remédio popular continua até os dias atuais. Uma pasta de açafrão indicada pelo sistema médico indiano antigo, o *Ayurvedic*, é usada para tratar infecções oculares comuns, cobrir feridas, tratar queimaduras, acne e outras doenças de pele. Mulheres recebem um tônico contendo pasta de açafrão fresco para beber após o parto, enquanto o cataplasma, uma pasta medicamentosa

resultante da mistura de diferentes ingredientes, tendo como base farinhas, raízes e folhas de açafrão, também é aplicado ao períneo para ajudar na cicatrização de quaisquer lacerações do canal, devido ao parto. Ainda é utilizado para curar tosse e infecções respiratórias, doenças dentárias, distúrbios digestivos, como dispepsia e acidez, indigestão, flatulência e úlceras. O açafrão assado é um ingrediente usado como antidiarreico para crianças, além de aliviar os efeitos alucinatórios do haxixe e outras drogas psicotrópicas (HATCHERA, 2008).

3.3 Composições da *Curcuma longa*

A *C. longa* contém 60-70% de carboidratos, 6-8% de proteína, 5-10% de lipídios, dos quais até 2% de óleos essenciais (turmerona, atlantona, e zingiberona), resinas e fibra, além de uma variedade de compostos químicos, incluindo curcuminóides, como a curcumina, desmetoxicurcumina, bisdesmetoxicurcumina, zinzibereno, curcufenol, curlona, linalol, turmeronas, curcumenos e ciclocurcumina (Figura 2) (BALIGA et al., 2012; JURENKA, 2009; NOORAFSHAN; ASHKANI-ESFAHANI, 2013; TRUJILLO et al., 2013). A cor amarela brilhante do açafrão é principalmente associada à curcumina, à desmetoxicurcumina e à bisdesmetoxicurcumina, pigmentos polifenólicos lipossolúveis (AKRAM et al., 2010). Em geral, o conteúdo de curcuminóides é de 3-5% (50-70% curcumina), mas pode variar entre 2 e 9%, dependendo das condições geográficas. A composição de curcuminóides é de aproximadamente 70% de curcumina, 17% desmetoxicurcumina, 3% de bisdesmetoxicurcumina e o resto (10%) é chamado ciclocurcumina, recentemente identificada (Figura 2). No entanto, o último composto tem sido associado à baixa ou nenhuma atividade biológica (ADIWIDJAJA; MCLACHLAN; BODDY, 2017; STANIĆ, 2016; TRUJILLO et al., 2013).

Figura 2 – Estruturas químicas dos fitoquímicos presentes em maior quantidade na *Curcuma longa*.



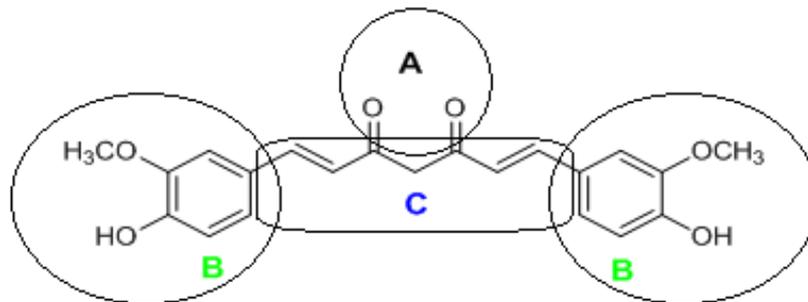
Fonte: Esatbeyoglu et al. (2012) e Sueth-Santiago et al. (2015).

Apesar dos três curcuminoides apresentarem atividade biológica, a maioria dos estudos indica a curcumina (1,7-bis(4-hidroxi-3-metoxi-fenil)-1,6-heptadieno-3,5-diona) como o componente mais ativo da *C. longa*, com destaque especial para a sua atividade antioxidante (KUMAR et al., 2016). Por outro lado, os demais curcuminoides são pouco estudados na forma isolada e, por isso, muitas dúvidas sobre suas atividades antioxidantes permanecem sem respostas (CAMATARI, 2017; NOORAFSHAN; ASHKANI-ESFAHANI, 2013).

3.4 A química de curcuminóides

A curcumina foi isolada pela primeira vez por Vogel, em 1815, e sua estrutura foi determinada por Milobedzka e Lampe, em 1910. Após isolamento e purificação, apresenta-se como um pó cristalino cor laranja-amarelo, praticamente insolúvel em água (SUETH-SANTIAGO et al., 2015; TRUJILLO et al., 2013). Possui três grupos funcionais: uma porção β -dicetona (Figura 3A), dois grupos fenólicos (Figura 3B) e duas ligações duplas conjugadas (Figura 3C) (HATCHERA, 2008; NOORAFSHAN; ASHKANI-ESFAHANI, 2013).

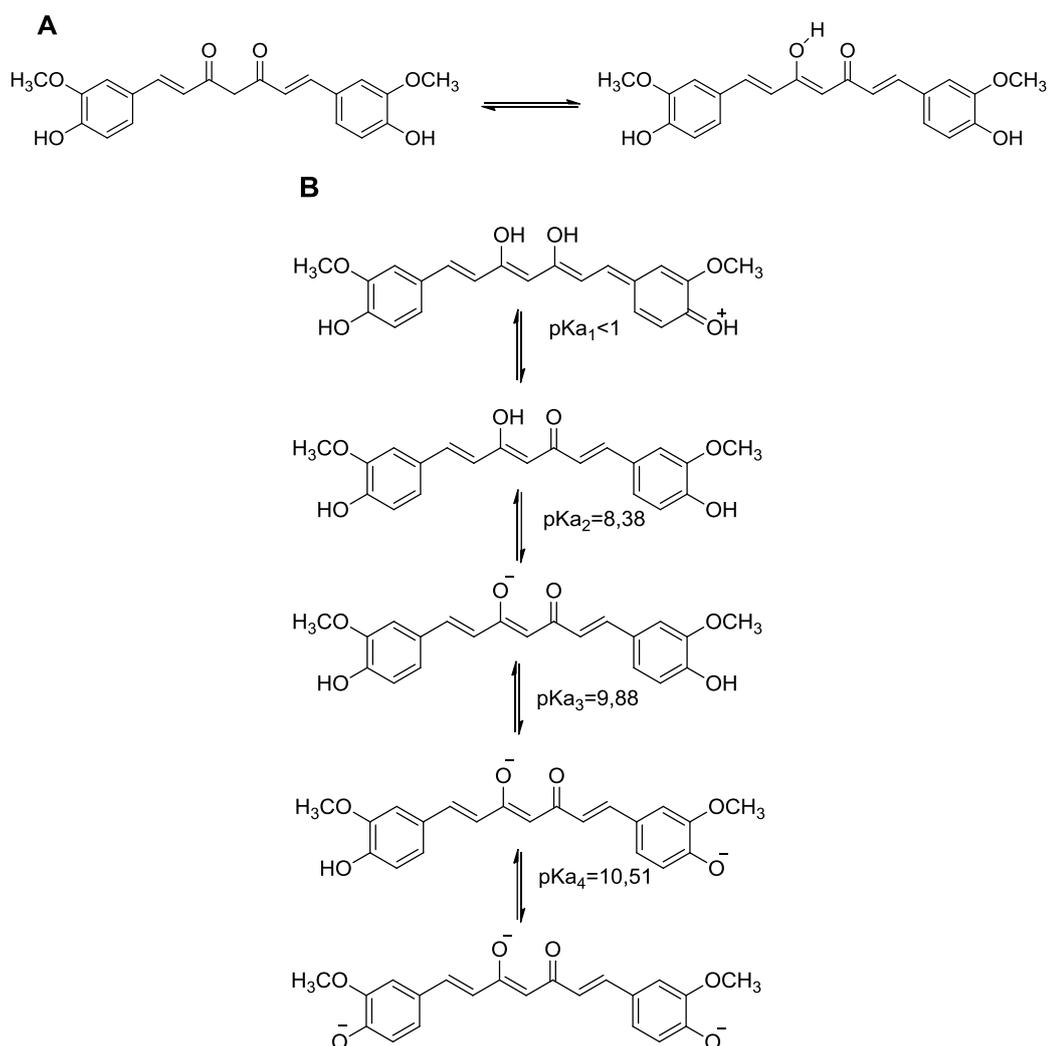
Figura 3 – Grupos funcionais na curcumina. (A) β -dicetona ou seu tautômero ceto-enol; (B) fenol; (C) ligação dupla conjugada.



Fonte: Hatcher et al. (2008) e Sueth-Santiago et al. (2015).

A porção β -dicetona encontra-se em equilíbrio ceto-enólico, como pode ser visto na Figura 4. Em geral, em meio aquoso, a curcumina permanece nas formas ceto-enólicas e normalmente se converte na forma enol em outros solventes, tanto próticos quanto apróticos. Em faixas de pH entre 3 e 7, o equilíbrio ceto-enólico desloca-se, preferencialmente, para o sentido enol, pela presença de uma ligação de hidrogênio intramolecular e de uma maior planaridade da molécula. Entretanto, a curcumina na forma ceto (mesmo em baixa concentração, quando comparada ao enol) possui um grupo metileno eletrodeficiente, em função da vizinhança eletrofílica (dois grupos carbonílicos), o que o torna um ótimo doador de hidrogênio radicalar ou próton (MONDAL; GHOSH; MOULIK, 2016; STANIĆ, 2017; SUETH-SANTIAGO et al., 2015). Essa capacidade doadora de hidrogênio pelo metileno parece ser um dos mecanismos principais, que explicam as propriedades antioxidantes da curcumina (Figura 4). Além disso, os dois grupos metoxila e os dois grupos hidroxila aromáticos podem desempenhar papel essencial, como por exemplo na atividade antioxidante exógena, em atividades biológicas atribuídas a esta molécula (SUETH-SANTIAGO et al., 2015; TRUJILLO et al., 2013).

Figura 4 – Equilíbrio ceto-enólico da curcumina (A) e reações de transferência de prótons, com respectivos valores de pKa (B).



Fonte: Adaptado de Priyadarsini (2009) e Sueth-Santiago et al. (2015).

A curcumina apresenta absorção em um amplo espectro na região UV-visível de 300 a 500 nm, devido à presença de grupos fenólicos, com forte influência do solvente. Em solvente orgânico, observa-se, geralmente, uma banda larga com máximo de absorvância em ~ 425 nm. Numa geometria planar, a enolização permite a conjugação entre os sistemas de elétrons π dos dois cromóforos feruloíla, via átomo de carbono hibridado sp^2 central, resultando na absorção de luz no visível (coloração transmitida amarela). A excitação eletrônica da transição $\pi \rightarrow \pi^*$ é responsável pela banda de absorção na faixa visível, e não uma transição $n \rightarrow \pi^*$. O primeiro estado

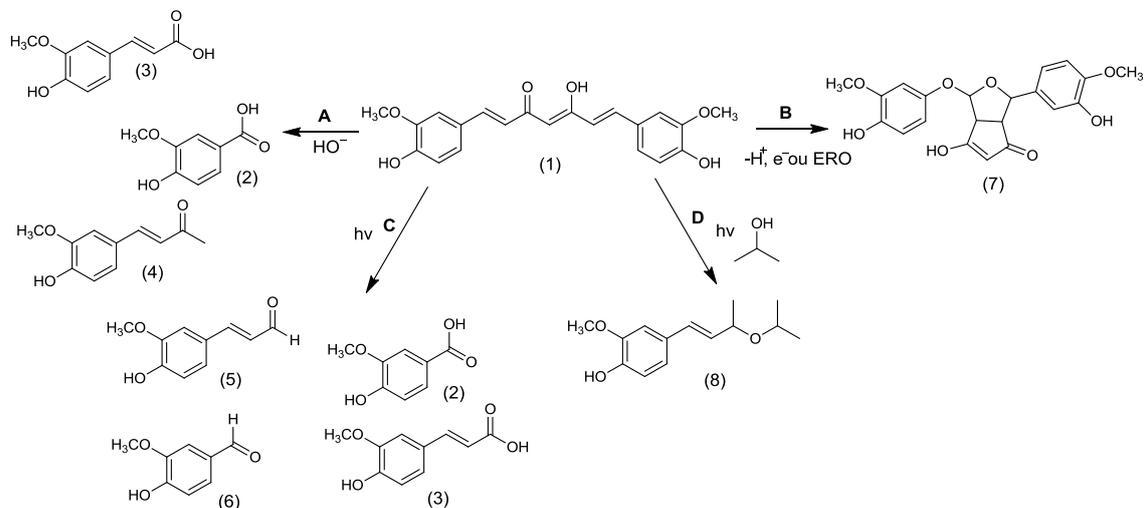
excitado da curcumina é altamente polar, devido à transferência de carga intramolecular a partir do anel fenila para a porção carbonila (VAN NONG et al., 2016).

Sobre a fluorescência, Van Nong et al. (2016) indicaram que, ao excitar em comprimento de onda de 425 nm, espectros de extratos de curcuminóides apresentaram emissão ampla entre 528 e 607 nm, indicando que, dependendo do extrato e do solvente utilizado na dissolução, há bandas em diferentes comprimentos de onda, na faixa citada. Dessa forma, a curcumina sofre efeito solvatocrômico, pela modificação da polaridade do solvente, por exemplo, sendo esta vermelha em metanol e amarela em diclorometano (INGÓLFSSON et al., 2014).

Além da polaridade do solvente, o pH também interfere no comprimento de onda máximo (λ_{max}) da curcumina, que é um ácido fraco, mas, como visto na Figura 4, apresenta três funções ácidas e, conseqüentemente, quatro valores de pKa estimados, correspondentes aos três equilíbrios prototrópicos, sendo o hidrogênio adjacente à carbonila o mais ácido deles ($pK_a = 8,38$). Os hidrogênios fenólicos são menos ácidos, entretanto, ainda existe debate sobre qual dos três, isto é, o hidrogênio enólico ou os hidrogênios fenólicos seja o mais ácido. A dissociação ácida induz a troca de coloração da curcumina de amarela para vermelha. A absorção máxima da curcumina completamente desprotonada (cor vermelha) em pH alcalino ($pH > 10$) é de 467 nm (KUNWAR; PRIYADARSINI, 2016).

As principais rotas de degradação da curcumina são mostradas na Figura 5. A solvólise em pH alcalino leva a inúmeros subprodutos de fragmentação (A). A autooxidação em meio tamponado leva à formação da biciclopentadienona, principal produto de degradação em condições aquosas (B). A fotodegradação ocorre quando a molécula está na forma cristalina e é dissolvida em solvente orgânico (C), como isopropanol (D), por exemplo. A curcumina mostra-se sensível à degradação térmica, Figura 6, e a variações no pH do meio, além de ser fotodegradável (sensível à luz) e sofrer auto-degradação no escuro. Em solução aquosa, ocorre fotodegradação e auto-degradação no escuro; no meio básico, a auto-degradação é diminuída; já o processo de degradação por aquecimento parece ser independente do solvente e do pH. Sugere-se que a porção β -dicetona na molécula seja a função química mais vulnerável, principalmente ao calor. Os produtos resultantes da degradação da curcumina são compostos como vanilina, ácido vanílico, ácido protocatecúico e compostos voláteis (MONDAL; GHOSH; MOULIK, 2016).

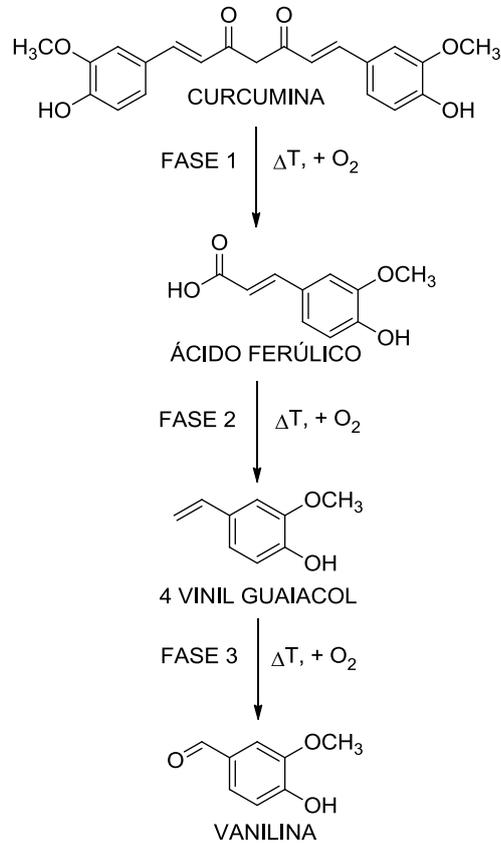
Figura 5 – Rotas de degradação química da curcumina: (A) Solvólise da curcumina (1) levando a vários subprodutos da fragmentação, com geração de: vanilina (2), ácido ferúlico (3) e feruloilmetano (4), em pH alcalino; (B) Autoxidação da curcumina em meio tamponado, com formação da biciclo-pentadienona (7), que é o principal produto de degradação em meio aquoso; (C) Fotodegradação que pode ocorrer quando a curcumina está na forma cristalina e é dissolvida em solvente orgânico, com subprodutos: vanilina (2), ácido ferúlico (3), aldeído ferúlico (5) e ácido vanílico (6); (D) Fotodegradação da curcumina em certos solventes orgânicos (como isopropanol), com formação de um derivado glicol (8).



Fonte: Adaptado de Griesser (2011).

Embora a abundância relativa desses produtos de degradação da curcumina seja diferente de acordo com o pH e temperatura de incubação, estes produtos também foram observados em meio de cultura celular e sangue humano. Análises espectroscópicas recentes revelam que a solvólise é a menor das vias de degradação, e que o produto de degradação majoritário é uma ciclopentadienona, que é produto da autoxidação da curcumina e formação de produtos de termólise (GRIESSER et al., 2011).

Figura 6 – Esquema da degradação da curcumina durante a torrefação a 180°C e correspondente formação de produtos de degradação selecionados.



Fonte: Adaptado de Griesser (2011) e Sueth-Santiago et al. (2015).

A incorporação espontânea de oxigênio (O_2), induzida por espécies reativas de oxigênio (EROS), leva à oxigenação e dupla ciclagem da cadeia heptadienona, conectando os dois anéis do metoxifenol. Um estudo mais aprofundado da cinética de degradação do composto radioativo identificou vários produtos de degradação que possivelmente se formaram na via da síntese da ciclopentadienona. Esta reação de oxidação ocorre sem iniciação fotoquímica, o que contribui, em parte, para as propriedades antioxidantes provenientes da *Curcuma* (SCHNEIDER et al., 2015).

Essas vias de degradação sugerem que, ao interpretar os resultados dos testes biológicos que envolvem a *Curcuma*, a complexidade dinâmica residual deve ser considerada. Embora a degradação oxidativa não exija iniciação fotoquímica, a degradação fotoquímica da *Curcuma* ocorre, como já mencionado, na forma cristalina e solubilizada, sob exposição à luz, resultando principalmente nos produtos vanilina

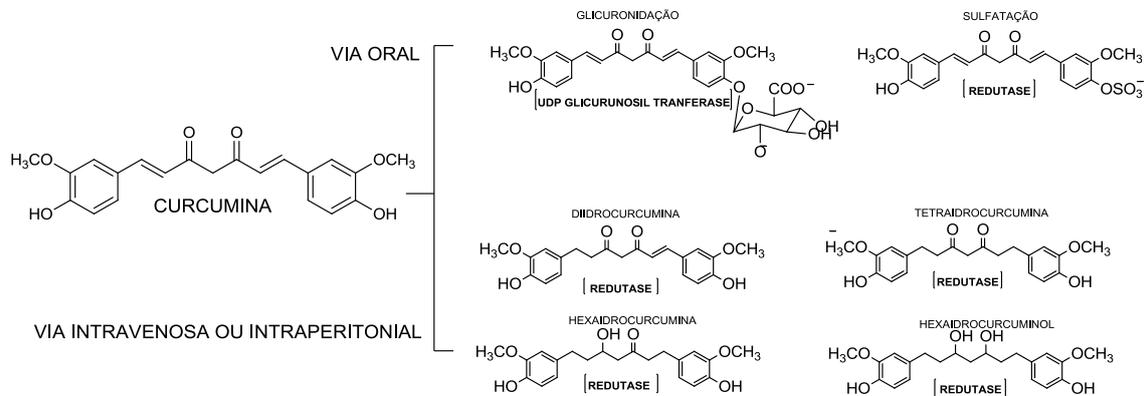
(2), ácido ferúlico (3), aldeído ferúlico (5) e ácido vanílico (6). Esse mesmo tipo de degradação foi observado para a curcumina em solventes orgânicos, quando exposta à luz (NELSON et al., 2017).

3.5 Metabolismo dos curcuminoides

A curcumina apresenta baixa biodisponibilidade após administração oral devido a vários fatores que limitam sua absorção, tais como: baixa solubilidade em meio aquoso ($\sim 0,456$ $\mu\text{g/mL}$, em pH 5,0) e, portanto, baixa taxa de dissolução e formação de outros compostos; instabilidade no pH intestinal, embora haja relato de que a curcumina exibe boa estabilidade entre valores de pH 3 e 6; e baixa permeabilidade intestinal em células de adenocarcinoma epitelial colorretal humano heterogêneo-2 ($\sim 0,07 \times 10^{-6}$ cm/s nas células Caco-2) (GUPTA et al., 2014; PRASAD; TYAGI; AGGARWAL, 2014). Essa biodisponibilidade reduzida torna o uso clínico da curcumina um desafio.

Estudos *in vivo* (ratos e camundongos) e *in vitro* (células hepáticas) confirmam que a curcumina é metabolizada em diferentes componentes após sua administração oral. Ela sofre conjugação metabólica, originando os principais derivados: o monoglicuronídeo de curcumina e o sulfato de curcumina, juntamente com metabólitos formados pela redução da(s) ligação(ões) dupla(s) alílica(s), gerando assim a tetraidrocurcumina, hexaidrocurcumina e hexaidrocurcuminol (ADIWIDJAJA; MCLACHLAN; BODDY, 2017) (Figura 7). A curcumina reduzida também é sujeita à glicuronidação, transformando-se em curcumina glicuronídeo e seus derivados, como um metabólito biliar menor, o ácido di-hidroferúlico, juntamente com vestígios de ácido ferúlico. Cabe ressaltar que esses metabólitos gerados são inativos em relação às atividades biológicas associadas ao seu uso. Esta característica, juntamente com a baixa solubilidade da curcumina em meio aquoso, torna esse polifenol pouco eficaz quando administrado *in vivo* (SUETH-SANTIAGO et al., 2015). Por outro lado, estudos indicam que alguns metabólitos da curcumina têm ações biológicas importantes, por exemplo, a tetraidrocurcumina inibe a peroxidação lipídica e induz a atividade de enzimas antioxidantes *in vitro*, e a hexaidrocurcumina tem capacidade para inibir a expressão da ciclooxigenase-2 (COX-2), enzima responsável pelos fenômenos da inflamação (ESATBEYOGLU et al., 2012; PRASAD; TYAGI; AGGARWAL, 2014).

Figura 7 – Metabolismo da curcumina quando administrada por via intravenosa, ou intraperitoneal, ou oral e suas respectivas enzimas catalizadoras.



Fonte: Adaptado de Anand et al. (2008), Pulido-Moran et al. (2016) e Sueth-Santiago et al. (2015).

Em relação à curcumina administrada na forma intravenosa (IV), estudos em animais demonstraram que a mesma é rapidamente metabolizada no fígado e intestino e excretada nas fezes, sem excreção pelo sistema urinário. A biodisponibilidade sistêmica é indicada como limitada, porém uma pequena quantidade ainda permanece detectável nos órgãos, como fígado e baço, além de ser captada rapidamente no cérebro e pulmão (JURENKA, 2009; PRASAD; TYAGI; AGGARWAL, 2014)

Algumas discussões sobre a biodisponibilidade têm sido feitas nos últimos anos, pois, mesmo apresentando baixa absorção, rápido metabolismo e eliminação sistêmica, a curcumina é uma molécula lipofílica rapidamente permeável entre as membranas celulares, tendo, por isso, importante utilização e atividade biológica em nível celular (NOORAFSHAN; ASHKANI-ESFAHANI, 2013).

3.6 Farmacocinética da curcumina

Dados farmacocinéticos e de biodisponibilidade confirmam que a distribuição sistêmica da curcumina tende a ser baixa, isto porque o metabolismo da curcumina ingerida, via oral, começa nas células epiteliais da mucosa intestinal, uma barreira altamente regulada composta por enterócitos cobertos de muco, pelos quais as moléculas de curcumina devem passar, entrando assim na circulação sistêmica. Mas, antes que o metabolismo intracelular ocorra, vários obstáculos farmacocinéticos

devem ser superados. Uma camada na mucosa intestinal, de pH básico, é repleta de glicoproteínas e lipídios conhecida por manter a curcumina indisponível; desta forma, o gradiente de concentração da curcumina pré-epitelial é diminuído e a passagem transmucosa da substância é prejudicada. Em segundo lugar, o muco intestinal contém classes de glutathione S-transferase (GST) que catalisam a conjugação de glutathione reduzida (GSH) a compostos eletrofílicos, incluindo a curcumina, resultando em biotransformação pré-enterocítica e redução da biodisponibilidade sistêmica do composto nativo. Por último, as moléculas de curcumina, que são absorvidas pelos enterócitos, estão sujeitas ao efluxo apical das células, de volta ao lúmen intestinal, aplicando-se também a curcumina que foi reduzida ou conjugada nos eritrócitos (LAO et al., 2006).

Em modelos animais, a biodisponibilidade, após doses orais de curcumina, gira em torno de 1% (YANG et al., 2007). Cheng et al. (2001) analisaram o soro de pacientes com várias lesões pré-cancerígenas e que receberam *Curcuma longa* oral por três meses. No estudo em questão, os autores observaram que aqueles pacientes que receberam suplementação oral de *Curcuma* (cápsula) com dosagens de 4.000 mg, 6.000 mg e 8.000 mg de curcumina, apresentavam, após 12 h, níveis séricos de apenas $0,51 \pm 0,11$, $0,63 \pm 0,06$ e $1,77 \pm 1,87$ mM, respectivamente, o que levou os autores a concluir que a curcumina apresenta baixa absorção (CHENG et al., 2001). Isto é compreensivo pois, como já mencionado, a curcumina possui uma baixa biodisponibilidade.

Por outro lado, em estudo conduzido com 12 pacientes em diferentes estágios de câncer colorretal, durante sete dias, observou-se que o emprego de 3,6 g de curcumina oral resultou em níveis farmacologicamente eficazes desse polifenol em ambos os tecidos colorretal maligno e colorretal normal ($12,7 \pm 5,7$ e $7,7 \pm 1,8$ nM respectivamente). Dessa forma, segundo os autores, essa concentração de apenas 1% da dose ofertada no tecido indica que os benefícios anti-inflamatórios de curcumina são observados, principalmente, em doenças do trato gastrointestinal (GARCEA et al., 2005). Foi também observado que o grau de distribuição de um certo composto no organismo tem grande impacto sobre a utilidade terapêutica. A curcumina vem sendo amplamente estudada em modelos animais, entretanto, sua aplicação clínica é mais limitada. Estudos em ratos relatam distribuição variável a

dependem do tipo de tecido. Este alto grau de variabilidade é devido à diferença na preparação da dose usada nos estudos (SIVIERO et al., 2015).

3.7 Atividades biológicas de curcuminóides

Como mencionado anteriormente, na medicina tradicional, a *C. longa* e a curcumina são usadas como medicamento oral e tópico para tratar uma ampla variedade de doenças. Numerosas investigações realizadas nos últimos 30 anos, especialmente na última década, indicam que os efeitos mais perceptíveis são o potencial antioxidante, anti-inflamatório e antitumoral (ADIWIDJAJA; MCLACHLAN; BODDY, 2017; BACK et al., 2017; IRVING et al., 2011). Adicionalmente, devido à sua capacidade de afetar uma grande gama de alvos moleculares, com um excelente perfil de segurança, a curcumina tem sido avaliada como um candidato potencial para a prevenção e/ou tratamento de um grande número de doenças (HANAI; SUGIMOTO, 2009).

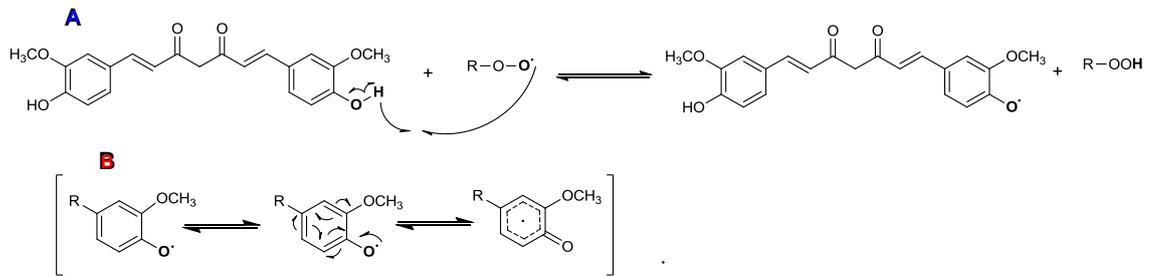
A versátil estrutura química da curcumina permite interação com um grande número de moléculas dentro da célula, levando a uma variedade de efeitos biológicos, mencionados anteriormente, e a inibição da produção de espécies reativas. A falta de toxicidade e efeitos secundários, bem como a sua disponibilidade em grandes quantidades como um produto natural, são vantagens adicionais na aplicação deste agente para a prevenção ao tratamento de uma variedade de doenças relacionadas ao desequilíbrio redox (STANIĆ, 2017).

O mecanismo antioxidante atribuído à curcumina, Figura 8, pode envolver um ou mais dos seguintes mecanismos: eliminação ou neutralização de espécies reativas, inibição de enzimas oxidativas, interação com oxigênio, tornando-o menos disponível para reações oxidativas, interação com a cascata oxidativa, com inibição de sua propagação, quelação ou desativação de propriedades oxidativas de íons metálicos, como o ferro (KUMAR et al., 2016).

A atividade antioxidante básica da curcumina depende diretamente da presença das duas subunidades estruturais, as hidroxilas dos grupos fenólicos e o grupo metileno central (Figura 8). Em ambos os casos, a atividade antioxidante está relacionada à doação de hidrogênio radicalar. Na subunidade fenol, os hidrogênios estão completamente disponíveis para a formação de radicais fenoxila, ocorrendo a

estabilização dos mesmos, por ressonância no anel aromático (Figura 8) (STANIĆ, 2017; SUETH-SANTIAGO et al., 2015).

Figura 8 – Mecanismo antioxidante da curcumina, envolvendo a doação de hidrogênio radicalar pelo fenol (A) e estabilização do radical formado, por ressonância no anel aromático (B).

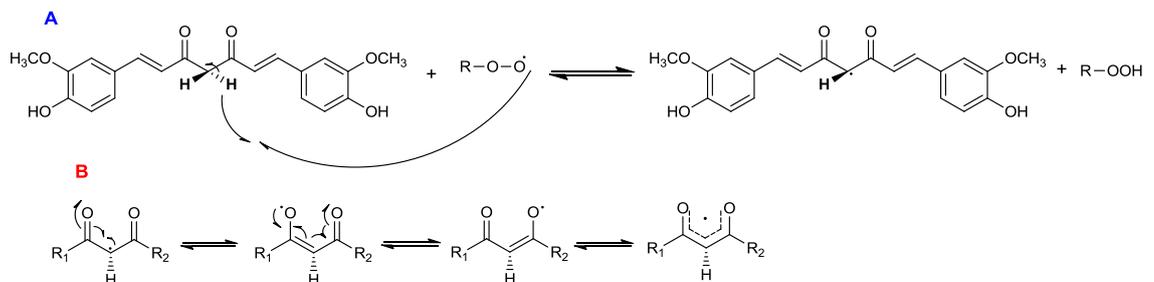


Fonte: adaptado de Sueth-Santiago et al. (2015).

Por reações semelhantes, um radical centrado em carbono origina-se do grupo metileno central da curcumina (Figura 9). Propõe-se que o grupo CH_2 α -dicarbonílico seja o sítio de reação, visto que as ligações CH neste carbono são mais fracas devido à ressonância ao efeito indutivo retirador de elétrons da vizinhança (STANIĆ, 2017).

A estabilidade do radical fenoxila é maior que a do radical carbônico, porém estudos indicam que a dissociação do hidrogênio do grupo metileno também contribui para a atividade antioxidante da curcumina. Dessa forma, a curcumina é vista como um poderoso antioxidante natural capaz de combater diferentes EROs e ERNs, como o $O_2^{\bullet-}$, 1O_2 , $HO\cdot$, $ROO\cdot$, H_2O_2 , $ONOO^-$ (KUNWAR; PRIYADARSINI, 2016).

Figura 9 – Mecanismo antioxidante da curcumina, envolvendo a doação de hidrogênio radicalar no metileno (A) e estabilização do radical formado (B).

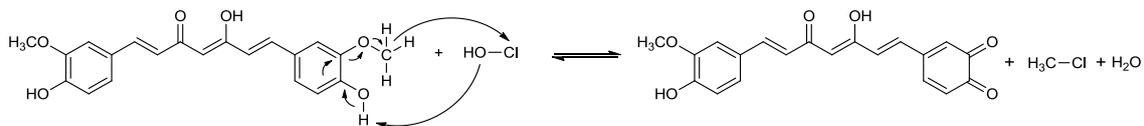


Fonte: adaptado de Sueth-Santiago et al. (2015).

Em relação à quelação ou desativação de propriedades oxidativas de íons metálicos, estudos *in vitro* indicam que a região A, a β -dicetona ou o grupo ceto-enol (Figura 10), são reconhecidos como complexantes de íons metálicos, como Mn^{2+} , $Fe^{2+/3+}$ e Cu^{2+} , tendo alguma estabilidade cinética ou termodinâmica em meios polares e/ou próticos, e propõe-se que tais interações sejam biologicamente significativas *in vivo* (HATCHERA, 2008).

Em relação à atividade da curcumina diante do ácido hipocloroso (HOCl), Yue et al. (2014) propuseram um mecanismo além dos citados, onde há envolvimento das metoxilas e das hidroxilas fenólicas, conforme mostra a Figura 11. Quando a curcumina interage com HOCl, a hidroxila de HOCl ataca primeiro o grupo hidroxila do fenol, que é estabilizada por ressonância. Este processo fornece um centro eletronegativo para o ataque eletrofílico do cátion cloreto, produzindo então o cloreto de metila (CH_3Cl). No final do processo, a curcumina é oxidada a uma *o*-quinona estável (YUE et al., 2014).

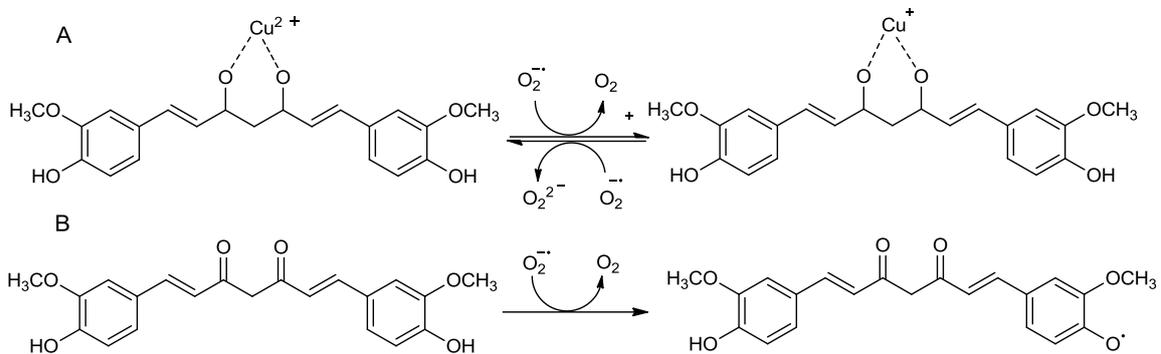
Figura 10 – Mecanismo proposto para a eliminação de HOCl pela curcumina.



Fonte: Adaptado de Yue et al. (2014).

Barik e colaboradores (2005) verificaram sua ação complexante de cobre (Cu^{2+}), formando o complexo (curcumina- Cu^{2+}), demonstrando, mais uma vez, sua eficácia antioxidante (Figura 11). O mecanismo de eliminação de ânion radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$) é exemplificado a partir do complexo curcumina- Cu^{2+} , sendo possível realizar o papel da superóxido dismutase (SOD) no processo de eliminação desse radical. Quando o $O_2^{\bullet-}$ reage com o complexo curcumina- Cu^{2+} , o $O_2^{\bullet-}$ reage com a porção Cu^{2+} , enquanto que apenas uma pequena fração reage com a curcumina. A reação provoca a redução Cu^{2+} em Cu^+ . O Cu^+ sofre oxidação subsequente por outra molécula de $O_2^{\bullet-}$, regenerando assim o complexo de origem e H_2O_2 (BARIK et al., 2005).

Figura 11 – Mecanismo de atividade de eliminação de ânion radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), do complexo curcumina-cobre (Cu^{2+}), em (A) complexo com cobre, e em (B) fenólica.



Fonte: Adaptado de Barik et al. (2005).

Em virtude do seu potencial efeito antioxidante, anti-inflamatório e antitumoral, diversos estudos, *in vivo* e *in vitro*, vêm testando as propriedades biológicas da curcumina em várias condições clínicas/fisiológicas, como pode ser visto no Quadro 1.

Quadro 1 – Efeitos da curcumina em situações clínicas, em diversos sistemas do organismo.

Sistema	Doenças	Dosagem e/ou concentração	Referência	Modelo	Efeito
Sistema Nervoso	Doença de Alzheimer	50 mg/kg	(KAKKAR; KAUR, 2011)	<i>In vivo</i> (ratos)	Melhora os efeitos adversos do cloreto de alumínio (AlCl ₃) envolvido na etiologia do Alzheimer.
	Tumor cerebral	1.63 mg/kg	(PURKAYASTHA et al., 2009)	<i>In vivo</i> (ratos) e <i>in vitro</i>	Bloqueia a formação de tumores cerebrais e elimina células tumorais pelo bloqueio da proliferação, sobrevivência e invasão das células no cérebro.
		10 mg/mL	(LIM et al., 2011)	<i>In vitro</i>	Inibe o crescimento de tumor cerebral de linhagens derivadas de tumor embrionário e de neurosfera de glioblastoma, pela modulação da proliferação celular pela interrupção nas fases G ₂ /M e indução apoptótica.
	Doenças neuro-degenerativas	50 mg/kg	(LIU et al., 2013)	<i>In vivo</i> (ratos)	Diminui a inflamação cerebral e exerce efeito neuroprotetor em doenças neurodegenerativas, por aliviar a hipoperfusão e afetar a homeostase do colesterol.
		50 e 100 mg/kg	(LIU et al., 2013)	<i>In vivo</i> (ratos)	Tem efeito neuroprotetor na lesão cerebral induzida pela isquemia cerebral crônica, pela diminuição do nível de (MDA) e aumento da atividade da (SOD).
	Traumatismo craniano	15 e 30 mg/kg	(SHARMA; KULKARNI; CHOPRA, 2006)	<i>In vivo</i> (ratos)	Regula moléculas envolvidas no equilíbrio da crise de energia após a lesão cerebral traumática.

	Isquemia	100 mg/kg	(SHUKLA et al., 2008)	<i>In vivo</i> (ratos)	Melhora no desempenho neurocomportamental; inibição da peroxidação lipídica; aumento na atividade da SOD e redução na área do enfarte.
	Depressão	20 mg/kg	(HUANG et al., 2011)	<i>In vivo</i> (ratos)	Efeito antidepressivo, possivelmente mediado pelo aumento da expressão de BDNF (manutenção dos neurônios).
	Encefalopatia (hepática)	100 mg/kg	(ROSELLÓ et al., 2008)	<i>In vivo</i> (ratos)	Diminui os danos no hipocampo pelo estresse oxidativo nas amostras com encefalopatia hepática de baixo grau.
Sistema Respiratório	Câncer de pulmão	50 mg/2.5 mL/kg	(ALEXANDROW et al., 2012)	<i>In vivo</i> (ratos)	Reduz a capacidade proliferativa do adenocarcinoma de pulmão.
		10 ou 20 μ M	(LIN et al., 2009)	<i>In vitro</i> (cultura celular)	Suprime a migração e invasão de células de câncer de pulmão, pela inibição de MMP-2 e MMP-9, proteinases que atuam na invasão, metástase e angiogênese de células cancerosas.
	Doenças inflamatórias do pulmão	100 ou 200 μ M	(LÜER et al., 2011)	<i>In vivo</i> (ratos)	Tem efeito antibacteriano no trato respiratório superior, inibindo o crescimento bacteriano, a adesão, a invasão e a ativação pró-inflamatória das células epiteliais.
Sistema Cardiovascular	Cardiomiopatia (ex: cardiomiopatia diabética)	150 mg/kg	(FARHANGKHO EE et al., 2006a)	<i>In vivo</i> (ratos)	Regula os níveis de eNOS e iNOS, diminuindo o estresse oxidativo, causado pela diabetes que causa cardiomiopatia.
	Hipertrofia e insuficiência cardíaca	5 e/ou 10 μ M	(MORIMOTO et al., 2008)	<i>In vivo</i> ratos	Previne a deterioração da função sistólica e os aumentos induzidos pela insuficiência cardíaca na espessura e no diâmetro da parede do miocárdio.

Sistema Urinário	Fibrose tubular renal	50 mg/kg	(LIU et al., 2013)	<i>In vivo</i> ratos	Atenua a fibrose túbulo-intersticial.
	Lesão oxidativa nos rins	50 mg/kg	(YOUSEF et al., 2010)	<i>In vivo</i> ratos	Útil na inversão da toxicidade do paracetamol, pela restauração das atividades de enzimas antioxidantes.
Sistema Reprodutor feminino e masculino	Danos oxidativos induzidos por toxinas (ex.: medicamentos, aflatoxina, pesticidas)	100 mg/kg	(NOORAFSHAN et al., 2011)	<i>In vivo</i> (ratos)	Melhora os parâmetros estruturais dos túbulos seminíferos e o número de células de Leydig (produz testosterona) nos testículos, alterados pelo metronidazol.
		200 mg/kg	(FAROMBI et al., 2007)	<i>In vivo</i> (ratos)	Recupera as lesões induzidas por di-n-butiltalato em parâmetros bioquímicos, espermatológicos e estrutura histológica do testículo.
		750 e 1500 mg/kg	(MATHURIA; VERMA, 2008)	<i>In vivo</i> (ratos)	Melhora a contagem de espermatozoides, a imobilização e viabilidade e as características morfológicas dos espermatozoides em proteção à aflatoxina.
		80 mg/kg	(GIANNESI et al., 2008)	<i>In vivo</i> (ratos)	Protege contra os danos causados nas células de Leydig nos testículos pela ingestão crônica de álcool: preserva a estrutura mitocondrial e o tamanho das células.
	Tumores do sistema reprodutor	10 mg/ml	(HONG et al., 2006)	<i>In vivo</i> (ratos) e <i>in vitro</i> (cultura celular)	Reduz o volume do tumor, da atividade de metaloproteinases (importantes na progressão tumoral) e dos nódulos metastáticos em câncer da próstata.

		10 - 50 μM	(NGG; QIANGSONG; CUIHUAN, 2004)	<i>In vitro</i> (cultura celular)	Inibe o crescimento de células cancerosas e induz apoptose de células de câncer do ovário.
	Inflamação prostática	1–50 μM	(NONN; DUONG; PEEHL, 2007)	<i>In vitro</i> (Cultura celular)	Diminui as alterações pró-inflamatórias induzidas por citocinas em células epiteliais prostáticas normais.
Sistema músculo- esquelético	Doenças inflamatórias (ex.: osteoartrite)	0-20 μM	(LEV-ARI et al., 2005)	<i>In vitro</i> (Cultura celular)	Inibe a atividade da COX-2, enzima pró-inflamatória, em células sinoviais de osteoartrite.
	Danos isquêmicos	100 mg/kg	(AVCI et al., 2012)	<i>In vivo</i> (ratos)	Protege contra a lesão de isquemia do músculo esquelético pela redução de citocinas pró-inflamatórias, com maior atividade antioxidante.
Doenças da pele	Câncer de pele	50 μM	(JEE et al., 1998)	<i>In vitro</i> (Cultura celular)	Induz a apoptose em carcinoma de células basais humanas; indicação na prevenção ou terapia do câncer de pele.
	Ferimento da pele	10%	(BHAGAVATHUL A et al., 2009)	<i>In vivo</i> (ratos)	Provoca cicatrização rápida e produção de colágeno na pele, em lesões superficiais por escoriação.
	Lesão cutânea oxidativa	100 mg/kg	(JAGETIA; RAJANIKANT, 2012)	<i>In vivo</i> (ratos)	Acelera a cicatrização da ferida por excisão profunda com irradiação.

Diabetes	10, 30 e 80 mg/kg	(MAHESH; MANOHARAN; BALASUBASHINI, 2004)	<i>In vivo</i> (ratos)	Diminui os níveis de glicose no sangue e normaliza os marcadores de peroxidação lipídica.
	0,5%	(SURYANARAYANA et al., 2007)	<i>In vivo</i> (ratos)	Controla o estresse oxidativo, inibindo o aumento de (TBARS) e a carbonilação de proteínas e inverte atividades de enzimas antioxidantes alteradas por (STZ).
	15 e 30 mg/kg	(SHARMA; KULKARNI; CHOPRA, 2006)	<i>In vivo</i> ratos	Atenua significativamente a disfunção renal e o estresse oxidativo em ratos diabéticos induzidos por (STZ).
	50, 150, ou 250 mg/kg	(NA et al., 2011)	<i>In vivo</i> (ratos)	Melhora a resistência à insulina muscular, aumentando a oxidação de ácido graxo e glicose.
	150 mg/kg	(FARHANGKHOEE et al., 2006)	<i>In vivo</i> (ratos) e <i>in vitro</i> (cultura celular)	Reduz os níveis de (eNOS) e (iNOS) em associação com a redução de dano oxidativo ao (DNA) e a proteínas.
	250 mg/capsula	(CHUENGSAARN et al., 2014)	<i>In vivo</i> (humano)	Aumenta o nível sérico de adiponectina e a diminui o nível de leptina; melhora dos perfis metabólicos.

Legenda: BDNF: Fator neurotrófico derivado do cérebro; COX-2: Ciclooxigenase-2; DNA: Ácido Desoxirribonucleico; eNOS: Óxido nítrico sintase endotelial; iNOS: Óxido nítrico sintase induzida; Fase G2m: duplicação do DNA e divisão celular da mitose; MDA: malondialdeído; MMP-2: Metaloproteinase -2; MMP-9: Metaloproteinase -9; STZ: Estreptozotocina; SOD: Superóxido dismutase; TBARS: Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico.

3.8 Toxicidade em modelos animais

A absorção oral de qualquer fármaco é de grande relevância e um ponto crítico na eficácia terapêutica. Com relação à segurança na suplementação, em todos os ensaios clínicos publicados, o uso da curcumina parece ser extremamente seguro, mesmo em doses de até 8 g/dia (JURENKA, 2009; PINTÃO; SILVA, 2008). A dose oral sem qualquer efeito adverso seria de até 12 g/dia, segundo diversas investigações (LAO et al., 2006; PULIDO-MORAN et al., 2016).

Tanto a *C. longa* como a curcumina são bem toleradas e apresentam baixa toxicidade em ratos (2,5 g de pó de *C. longa* ou 300 mg do seu extrato etanólico por kg peso corporal, durante 3 semanas) e em seres humanos (500 mg de curcumina por dia, durante 7 dias) (NOORAFSHAN; ASHKANI-ESFAHANI, 2013). Qiu et al. (2016) investigaram, especialmente, o efeito de superdosagem de curcumina em ratos (100 mg de curcumina por kg de peso corporal, 5 dias por semana, durante 90 dias) e indicaram que essa superdosagem, a longo prazo, poderia iniciar um estado de desequilíbrio orgânico, com diminuição do peso corporal dos animais e indução de lesão hepática, através do estímulo ao estresse oxidativo, distúrbios inflamatórios e metabólicos. Contudo, mesmo em dosagens mais elevadas, a curcumina pode desempenhar papéis antioxidante e anti-inflamatório pronunciados na proteção contra lesões hepáticas, indicando, assim, que a administração habitual dos curcuminóides é segura.

Já Qureshi e colaboradores (2017) verificaram a toxicidade em camundongos albinos, tanto machos como fêmeas, utilizando a mesma dosagem de 100 mg por kg de peso corpóreo. Os autores não observaram diferença na mortalidade dos animais e nem alteração no peso corpóreo, em comparação ao grupo controle. No entanto, eles observaram um aumento significativo nos pesos dos órgãos vitais, como coração e pulmões, e redução nos níveis de glóbulos vermelhos e brancos. Aggarwal e colaboradores (2008) não encontraram efeitos tóxicos e qualquer sinal de anomalia, quando submeteram ratos albinos *Wistar* a doses de 100, 500 e 1000 mg/ kg de peso corporal de curcuminóides. Deshpande e colaboradores (2015), por sua vez, administraram 5% de açafrão por Kg de ração para camundongos *Swiss*, por 90 dias, e perceberam uma diminuição significativa de peso corporal e necrose local no fígado.

Com exceção da curcumina, o metabolismo dos outros curcuminóides, em termos de absorção, utilização e excreção, é muito pouco explorado. Entretanto, pela

similaridade estrutural entre eles, pode-se esperar semelhanças metabólicas. Ressalta-se, porém, que a farmacocinética da curcumina ainda precisa de esclarecimentos adicionais, afim de que doses possam ser recomendadas com segurança (LIJU; JEENA; KUTTAN, 2013; NOORAFSHAN; ASHKANI-ESFAHANI, 2013; SOLEIMANI; SAHEBKAR; HOSSEINZADEH, 2018).

3.9 Doenças inflamatórias intestinais (DII) e curcumina

As doenças inflamatórias intestinais (DII) são compostas, principalmente, pela Doença de Crohn (DC), que pode acometer qualquer parte do trato gastrointestinal, desde a boca até o ânus e a colite ulcerativa idiopática (CUI), que se restringe ao intestino grosso e/ou reto. Ambas se caracterizam pela ativação imune crônica e recorrente no trato gastrointestinal (HALPIN; FORD, 2012). A etiologia da DC e da CUI permanece desconhecida, contudo, fatores ambientais, infecciosos, imunológicos e fisiológicos, juntamente com a suscetibilidade genética, podem ser os principais responsáveis pela gênese das DII (MEDHI et al., 2008).

A prevalência e incidência das DII vêm aumentando em todo o mundo, em especial nos países em desenvolvimento, como o Brasil. Mais de 1 milhão de pessoas nos Estados Unidos e 2,5 milhões de pessoas na Europa são acometidas pela DC ou CUI, gerando um custo efetivo de US\$6 bilhões e €4,6–5,6 bilhões por ano, respectivamente (KAPLAN, 2015; MALIK, 2015). No Brasil, ainda não há dados epidemiológicos sobre a prevalência e incidência gerais das DII, apenas estudos pontuais em alguns estados, como Mato Grosso (DE SOUZA et al., 2008), São Paulo (VICTORIA; SASSAK; NUNES, 2009), Minas Gerais (FARIA; DE ABREU; DA CUNHA, 2004), Pernambuco (SALVIANO; BURGOS; SANTOS, 2007) e Alagoas (DE BARROS; DA SILVA; LINS NETO, 2014).

A maioria desses trabalhos, com exceção de Alagoas, indica maior prevalência de CUI em relação à DC, porém, com um aumento progressivo desta última, que apresentando maior incidência. No entanto, esses dados não permitem ainda criar um panorama das DII no país. A baixa notificação pode ser a responsável pelo Brasil ainda ser considerado uma área de baixa endemicidade para esse transtorno, visto que o registro em prontuário de casos de diarreias (principal sintoma das DII), de etiologia bacteriana ou parasitária, é considerado elevado (DE SOUZA; BELASCO;

DE AGUILAR-NASCIMENTO, 2008). Outros dados epidemiológicos sobre as DII, observados tanto internacionalmente, quanto no Brasil, indicam a maior prevalência entre as mulheres, brancos e moradores da zona urbana (VICTORIA; SASSAK; NUNES, 2009).

A terapia convencional das DII envolve o uso de sulfasalazina, corticoides, agentes imunossupressores, como a azatiopina, além de terapia biológica, representada pelo anticorpo anti-TNF α (fator de necrose tumoral alfa), usados para o controle da resposta imune aberrante e da inflamação (RUTGEERTS et al., 2009). Por outro lado, os efeitos adversos associados ao uso prolongado destes fármacos e a elevada taxa de recaídas limita de forma importante seu uso, durante as diversas fases da doença (sintomática e não sintomática) (BARNES; ADCOCK, 2009). Além disso, estes fármacos exibem ações benéficas limitadas. A longo prazo, entre 25% e 33% dos pacientes com CUI necessitarão de alguma intervenção cirúrgica, caso a terapia medicamentosa não apresente sucesso, ou em casos de complicações clínicas, como úlceras, fístulas, estenoses ou abscessos, sendo estes últimos muito comuns na DC (ZHU; LI; LINGLONG, 2012). Estes fármacos, quando usados por um longo período de tempo, podem induzir efeitos colaterais graves, e, juntamente com o elevado custo da terapia medicamentosa/cirúrgica, estimulam investigações para terapias alternativas não farmacológicas (FOK et al., 2012).

Diante disso e do crescente interesse no estudo do estresse oxidativo, levando à disruptura da sinalização redox e ao controle/dano molecular, como fator etiológico importante nas DII (FANG et al., 2013; MOURA et al., 2015), a comunidade científica vem comprovando que o desequilíbrio redox está presente em ambas as fases da doença, ou seja, fase aguda (sintomática) a colite tóxica ou fulminante se apresenta com diarreia súbita e violenta, febre acima de 40°C, dor abdominal, sinais de peritonite como por exemplo: descompressão brusca presente e profunda toxemia. Os sinais e sintomas sistêmicos, mais comuns na colite ulcerativa grave, incluem mal-estar geral, febre, anemia, anorexia e perda de peso. Manifestações extraintestinais da DII, em particular, complicações articulares e cutâneas são mais comuns quando há sintomas sistêmicos, e fase de remissão (assintomática) quando a ulceração é confinada ao reto-sigmoide, as fezes podem ser normais ou duras e secas, mas a eliminação retal de muco com leucócitos e eritrócitos pode vir junto ou nos intervalos das evacuações. Nesse caso sintomas sistêmicos estão ausentes ou são leves. Caso as ulcerações se

estendam proximalmente, as fezes tornam-se mais amolecidas e o paciente pode apresentar mais de 10 evacuações por dia, em geral com cólicas intensas e tenesmo significativo, de dia e de noite. As fezes podem ser aquosas e conter muco ou com frequência consistirem inteiramente em sangue e pus. (ACHITEI et al., 2013). Adicionalmente, diversos estudos têm sugerido que a administração de antioxidantes, de diferentes tipos, que também apresentam ação anti-inflamatória, pode ser benéfica no tratamento das DII, uma vez que a inflamação pode ser também causada pelo EO, como gerador desse desequilíbrio oxidativo, levando ao aumento do dano tecidual (LANGMEAD; RAMPTON, 2005; NG et al., 2014; RAHIMI; SHAMS-ARDEKANI; ABDOLLAHI, 2010).

Desta forma, estudos sobre os efeitos da curcumina, como anti-inflamatório, antioxidante, antitumoral, entre outros, foram realizados no contexto das DII em modelos animais, em ensaios *in vitro* e em ensaios clínicos, de forma isolada ou combinada com medicamentos de uso tradicional na doença, como a mesalassina, com resultados promissores e sem evidência de efeitos adversos. O Quadro 2 lista os principais efeitos atribuídos à curcumina, que estão relacionados às atividades anti-inflamatória, antioxidante e anticancerígena.

Quadro 2 – Efeitos da curcumina em situações clínicas, relacionados aos sistemas digestório e hepatobiliar.

Doenças	Dosagem e/ ou concentração	Referência	Modelo	Efeito
Fibrose hepática	50 mg/kg	(LIU et al., 2016)	<i>In vivo</i> (ratos)	Inibe o desenvolvimento de cirrose hepática induzida pela tioacetamida.
Doença inflamatória intestinal (doença de Crohn, colite ulcerativa)	100 mg/kg	(ZHAO et al., 2016)	<i>In vivo</i> (camundon-go)	Suprime a ativação de células dendríticas envolvidas na patogênese da doença inflamatória intestinal, e restaura o equilíbrio imunológico no tratamento da colite experimental.
	550 mg/dia	(HOLT; KATZ; KIRSHOFF, 2005)	<i>In vivo</i> (camundon-go)	Diminui o índice de atividade da doença de Crohn (IADC) e taxas de sedimentação de eritrócitos.
	100 mg/kg	(YANG et al., 2017)	<i>In vivo</i> (ratos)	Reduz a excreção de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-6 e IL-12) e a produção de espécies reativas de oxigênio.
	5, 25, 50 e 100 mg/kg	(GUGULOTHU et al., 2014)	<i>In vivo</i> (ratos)	Atenua o processo inflamatório.
	10–100 μ mol/L	(GUAN et al., 2017)	<i>In vivo</i> (ratos)	Reduz significativamente a perda de peso corporal, recuperou o comprimento do cólon, diminuiu IADC score microscópico, citocinas pro-inflamatórias reguladas, diminui o estresse oxidativo e a redução na expressão do MyD88, (TLR4) e (NF-kappa B p65).
	2% M/V	(UNO et al., 2006)	<i>In vivo</i> (ratos) e <i>in vitro</i> (cultura celular)	Diminui a expressão de RNAm e da proteína Phex, através de um mecanismo transcricional, inibição da mineralização dos osteoblastos.

	10 µM	(BINION et al., 2009)	<i>In vitro</i> (cultura celular)	Inibi a expressão de VCAM-1 em HIMECs, através do bloqueio de Akt, p38 MAPK e NF-kappa B.
	10 mg	(GUAN et al., 2017)	<i>In vitro</i> (cultura celular)	Observada atividade biológica significativamente prolongada. Estudos de perfusão unidirecional demonstraram maior coeficiente de permeabilidade efetiva e constante de taxa de absorção para as nanoemulsões (10–100 µmol/L) para a biodisponibilização da curcumina.
	30 mg/g	(BELOQUI et al., 2016)	<i>In vivo</i> (ratos)	Maiores valores de permeabilidade das monocamadas de células Caco-2 quando comparadas (NC> SNEDDS> suspensão NLC e CC), diminuição TNF-α, diminuição da inflamação.
	100 mg/kg	(KONDAMUDI et al., 2015)	<i>In vivo</i> (ratos)	Atenua os níveis de MPO e nitritos, IL-6 e TNF-α, comportando-se iguais ao controle.
	50 mg/ kg	(UKIL et al., 2003)	<i>In vivo</i> (ratos)	Diminuiu o aparecimento de diarreia e a ruptura da arquitetura do cólon, diminui MPO, MDA, serina protease, NO, O ₂ ^{•-} e citocinas.
	100 mg/kg	(ARAFI et al., 2009)	<i>In vivo</i> (ratos)	Atenua todos os parâmetros bioquímicos, MPO, GSH, TNF-α, GST, NO e MDA.
	50 µM	(MIDURA-KIELA et al., 2012)	<i>In vitro</i> (cultura celular)	Inibe IFN-γ, genes CII-TA, MHC-II e a ligação do Stat1.
	100 mg/kg	(ZHAO et al., 2016)	<i>In vivo</i> (ratos)	Diminui o peso e escore histológicos, inibe a produção de IL-10 e IFN-γ e GM-CSF, IL-12, p70, IL-15, IL-23 e TGF-β, inibe a fosforilação de JAK2, STAT3 e STATE, as três proteínas desta via foram altamente expressas (SOCS1, SOCS3 e PIAS3).
	4 g/dia	(GOPU et al., 2015)	<i>In vivo</i> (ratos)	Diminui os níveis de HDL, FAC e níveis plasmáticos de IL-1β, TNF-α, MPO e níveis de peroxidação lipídica; aumenta prostaglandinas colônicas E-2 e IL-10 e restaura alterações histopatológicas.

	100 mg/kg	(YANG et al.,2017)	<i>In vivo</i> (ratos)	Curcumina, Cur-OH e Cur-Br suprimem a produção de NO e diminuem a expressão de iNOS, COX-2 e NF-Kappa β .
	100 mg/kg	(ZHAO et al., 2016)	<i>In vivo</i> (ratos)	Os níveis de IL-10, IFN- γ e TGF- β 1 apresentaram-se aumentados, diminui o índice de atividade da doença, o peso e o índice do cólon e o escore histológico; recuperação do comprimento do peso e comprimento do cólon; as células CD8 (+) CD11c (+) diminuem no baço e a expressão do complexo de histocompatibilidade principal foi inibida.
	10% M/V	(SAREEN; JAIN; DHAR, 2016)	<i>In vitro</i> (cultura celular)	Redução significativa na gravidade e extensão do dano colônico, confirmada por estudo histopatológico.
	20 mg/kg	(SONG et al., 2010)	<i>In vivo</i> (ratos) e <i>in vitro</i> (cultura celular)	Diminuição dos níveis de D-lactato, DAO, MPO, ICAM-1, IL-1 β e TNF- α , aumento dos níveis de IL-10 e SOD; ativação da MAP Quinase 1, inibição da fosfo-p38 e NF-kappa β .
	1, 10, e 100 μ mol/L	(BAEK et al., 2003)	<i>In vitro</i> (cultura celular)	Inibe a ativação de mastócitos humanos mediada por PAR2 e PAR4, bloqueio da (ERK).
	72%	(SINGLA et al., 2014)	<i>in vivo</i> (humanos)	Melhora significativamente no grupo NCB-02, em termos de resposta clínica, remissão clínica, melhora endoscópica, em comparação ao grupo placebo.
	50–100 mg/kg	(CAMACHO-BARQUERO et al., 2007)	<i>in vivo</i> (ratos)	Diminui significativamente MPO, TNF- α , NO ₂ , COX-2 e NOS e p38 MAPK.
	20 μ M	(EPSTEIN et al., 2010)	<i>in vivo</i> (humanos)	Reduz a ativação da MAPK p38,IL-1 β e aumenta IL-10.
	0,2%	(COONEY et al., 2016)	<i>In vivo</i> (ratos)	Diminui moléculas reguladoras (ERK, FN1, TNFSF12 e complexo PI3K) pós- intervenção.

	50 ou 100 mg/kg	(ALVES JÚNIOR et al., 2017)	<i>In vivo</i> (ratos)	Aumenta a quantidade de mucinas ácidas no fluxo intestinal no cólon.
	0.25 g	(SAREEN; JAIN; DHAR, 2016)	<i>In vivo</i> (ratos)	Reduz o dano colônico, confirmado por estudo histopatológico.
	25 mg/ kg	(MOUZAOU; RAHIM; DJERDJOURI, 2012)	<i>In vivo</i> (ratos)	Diminui MPO, NO, MDA e apoptose celular no cólon e fígado.
	40 mg/kg	(YU et al., 2015)	<i>In vivo</i> (ratos)	Diminui o número de escores fecal, aumenta os níveis de serotonina, BDNF e pCREB; entretanto, diminui estes níveis no cólon. Melhora endoscopicamente a indução e a remissão.
	3 g/dia	(SALOMON et al., 2013)	<i>In vivo</i> (humanos)	Reduz TNF- α , a proliferação de células T, anti-CD-3 e IL-8.
	3 g/dia	(SALOMON et al., 2015)	<i>In vivo</i> (humanos)	Aumentos superiores ao placebo para indução e remissão clínica e endoscópica em CUI leve a moderada, sem efeitos adversos aparentes.
	2 g	(HANAI et al., 2006)	<i>In vivo</i> (humanos)	Resultados superiores para indução e remissão clínica.
	5mM	(LANG; SALOMON; BEN-HORIN, 2016)	<i>In vivo</i> (humanos)	Na análise de intenção de tratar, resposta clínica e remissão; pacientes tratados com curcumina em comparação ao grupo placebo obtiveram resultados superiores ao grupo placebo.
	5, 25 ou 50 mg/kg	(TODEN et al., 2017)	<i>In vivo</i> (ratos)	Melhora no índice de atividade da doença (IAD) dose-dependente, aumento nas citocinas, incluindo IL-10 e IL-11, FOXP3.

	550 mg	(HOLT; KATZ; KIRSHOFF, 2005))	<i>In vivo</i> (humanos)	Inibe a formação de IL-2, TNF- α , NF κ B. Suprime CD4 (+), Infiltrados de células T e ativação de NH κ B, bem como diminui a atividade de MAPK p38.
	100 mg/kg	(YILDIRIM et al., 2016)	<i>In vivo</i> (camundongo)	Diminui o peso e tamanho do cólon nos grupos tratados com <i>Curcuma</i> e sulfalazina; diminui a MPO em todos os grupos tratados.
	2%	(BILLEREY-LARMONIER et al., 2008)	<i>In vivo</i> (ratos)	Aumento da sobrevivência e prevenção da perda de peso BALB/c, inibição da proliferação de esplenócitos e estímulo da ConA, a inibição de CD4(+) em BALB/c e SJL / J, IL-4 e IL-5 apenas em BALB/c.
	50 ou 100 mg/kg	(LIU et al., 2013)	<i>In vivo</i> (ratos)	Diminui o IAD, escore histológico e aumenta a atividade de fosfo-STAT3. MPO, IL-1 β , expressão de TNF- α foram reduzidos.
	100 mg/kg	(YANG et al., 2017)	<i>In vitro</i> (cultura celular)	Diminui expressão colônica de TRPV1 e pTRPV1.
	100 mg/kg	(TOPCU-TARLADACALISIR et al., 2013)	<i>In vitro</i> (cultura celular)	Diminui a atividade da MPO e MDA.
	5%	(RACHMAWATI et al., 2017)	<i>In vivo</i> (ratos)	Aumenta indicadores cinéticos, como Tmax, Cmax e AUC 0- ∞ .
	100 mg/kg	(ZENG et al., 2013)	<i>In vivo</i> (ratos)	Reduz IAD, IDMC, escore histológico, MPO, expressões do mRNA do NF-kappa B, mRNA da IL-27, proteína TLR4, NF-kappa B, proteína p65 e proteína IL-27 p28.
	100 e 200 mg/kg	(LUBBAD; ORIOWO; KHAN, 2009)	<i>In vivo</i> (ratos)	Diminui a expressão tecidual de NF κ B, MDA, MPO e reduz os escores histológicos.

	2 g/dia	(HANAI et al., 2006)	<i>In vivo</i> (humanos)	Diminui a reincidência, IAC e IE.
	50 ou 200 mg/kg	(KADRI et al., 2017)	<i>In vivo</i> (ratos)	Reduz a inflamação da mucosa e o conteúdo de MPO.
	2%	(MOTAWI; RIZK; SHEHATA, 2012)	<i>In vivo</i> (ratos)	Diminui os níveis de TNF- α , NO, MPO, hidroxiprolina, MMP-1, MMP-3, TIMP-1 e ferroxidase, tanto no soro com no tecido.
	0.2%	(OHNO et al., 2017)	<i>In vivo</i> (ratos) e <i>in vitro</i> (cultura celular)	Atenua a perda de peso, IAD, escore histológico, NF-Kappa- β , RNAm. Aumenta a quantidade de bactérias butirato e o butirato fecal, células T CD4 (+), Foxp3 (+), CD103 (+) e CD8 alfa (-).
	0,5, 2,0 ou 5,0%	(SUGIMOTO et al., 2002)	<i>In vivo</i> (camundongo)	Melhora nos sinais histológicos e histopatológicos do cólon, diminui os níveis de células T CD4 (+) NFKappa- β e RNAm.
	50-100 mg/kg	(MANUEL SANCHEZ-CALVO et al., 2009)	<i>In vivo</i> (ratos)	Reduz o grau de lesão colônica, o índice de infiltração de neutrófilos e a secreção de citocinas Th1; reduz na ativação de MAPKs p38, JNK, nitritos superexpressão de COX-2 e iNOS; aumenta a produção de IL-10.
	100 μ g/g	(LARMONIER et al., 2011)	<i>In vivo</i> (ratos) e <i>In vitro</i> (cultura celular)	Atenua a expressão de LPS, PMN, IL-2 β , IL-8.
	15, 30, e 60 mg/kg	(LI et al., 2015)	<i>In vivo</i> (ratos)	Diminui os níveis de TNF- α e MPO, MAPK p38, RNAm.
	500 mg	(SUSKIND et al., 2013)	<i>In vivo</i> (humanos)	Melhora no IAD.

Lesões hepáticas	50 mg/kg	(YOUSEF et al., 2010)	<i>In vivo</i> (ratos)	Restaura as atividades das enzimas antioxidantes; proteção da histologia do fígado e normalização das funções do fígado por toxicidade do paracetamol.
	15 mg/kg	(YOUSEF; EL-DEMERDASH; RADWAN, 2008)	<i>In vivo</i> (ratos)	Protege as alterações bioquímicas no fígado induzidas por arsenito de sódio.
	40 µM	(MESSNER; SIVAM; KOWDLEY, 2008)	<i>In vivo</i> (ratos)	Reduz o estresse oxidativo dependente do ferro e a toxicidade do ferro em células epiteliais de fígado, sem bloquear a captação de ferro.
Inflamação no epitélio intestinal	1 µM	(LOGANES et al., 2017)	<i>In vitro</i> (cultura celular)	Reduz os níveis de IL-7.
Câncer de cólon	200 mg/kg	(UNG et al., 2015)	<i>In vivo</i> (ratos)	Aumenta a sobrevivência, diminui a relação peso / comprimento do cólon, melhora a histologia colônica.

Legenda: AUC 0-∞: Área sobre a curva de 0 ao infinito; CII-TA: Cromatina transativador classe II e MHC-II: Complexo principal de histocompatibilidade II; Cmax : concentração máxima; ConA: Concanavalina A; COX-2: Ciclooxigenase-2; FN1: Fibronectina 1; Foxp3 (+): Família de proteínas FOX 3; IAD: Índice de atividade da doença; IFT-γ 1: Interferon gamma 1; IL: interleucina; iNOS: Óxido nítrico sintases induzida; JAK2: Janus quinase 2; LPS: Lipopolissacarídeo; PMN: Polimorfonucleares; MAPK p38: Proteínas quinases ativadas por mitógeno 38; MMP: Metaloproteína; MPO: Mieloperoxidase; MyD88: fator de diferenciação mieloide 88; NF-kappa B p65: Fator nuclear kappa B p65 Proteínas: NFKappa-β: Fator nuclear kappa B; NO: óxido nítrico; PAR: Receptores Ativados por Proteases; Phex: Gene regulador de fosfato com homologias para endopeptidases no cromossomo X; PRL-3: fosfatase de regeneração hepática; RNAm: Ácido ribonucleico mensageiro; SOCS: Supressores da sinalização de citocinas; STAT3: transdução e ativação da transcrição 3; TGF-β 1: Fator de crescimento transformador beta 1; TLR4: Receptor toll-like 4; Tmax: temperatura máxima; TNFSF12: Superfamília do fator de necrose tumoral membro 12, (ligante); TNF-α: fator de necrose tumoral alfa; TNF-α: Fator de necrose tumoral; TRPV1: Potencial do receptor transitório vanilóide 1.

Como se pode observar no quadro 2, vários trabalhos foram encontrados com DII associada ao uso dos curcuminóides. Trabalhos como o de Sareen e colaboradores 2016, que investigou o tratamento da CUI, através do uso de microesferas de quitosana com curcumina, tanto em animais como em meio de cultura, mostram, histopatologicamente, uma redução na gravidade e extensão do dano, em comparação à oferta de curcumina não encapsulada. Já em trabalhos como o de Ulkil e colaboradores 2003, que investigou os efeitos protetores da curcumina na DII, os autores observaram, histopatologicamente, uma diminuição na ruptura da arquitetura colônica, em doses que variam entre 50 a 300 mg kg⁻¹ por dia, durante 10 dias, em doses mais elevadas, houve redução na infiltração de neutrófilos e diminuição da peroxidação lipídica, bem como da atividade da serina protease e dos níveis de NO e O₂^{*}, associados à expressão favorável de citocinas Th1, Th2 e diminuição do NF-Kappa B na mucosa colônica.

Camacho-Barquero e colaboradores 2007, com o uso de uma dosagem de 50 e 100 mg kg⁻¹ por dia, administrada oralmente por gavagem, durante 14 dias, perceberam uma atenuação do dano causado pela CUI e diminuição da atividade da MPO e TNF- α , redução nos níveis de nitritos no cólon, indução da regulação negativa da expressão de COX-2, iNOS e diminuição na ativação de p38 MAPK. Outros estudos demonstraram que o uso de 15 a 60 mg kg⁻¹ diários (LI et al., 2015) ou de 100 mg kg⁻¹ (ARAFÁ et al., 2009), durante um período mais curto, de apenas 7 dias, diminuiu os níveis de TNF- α , MPO e a expressão de p-38 MAPK. Esse marcador, quando inibido, reduz a sinalização para a liberação de TNF- α e mRNA.

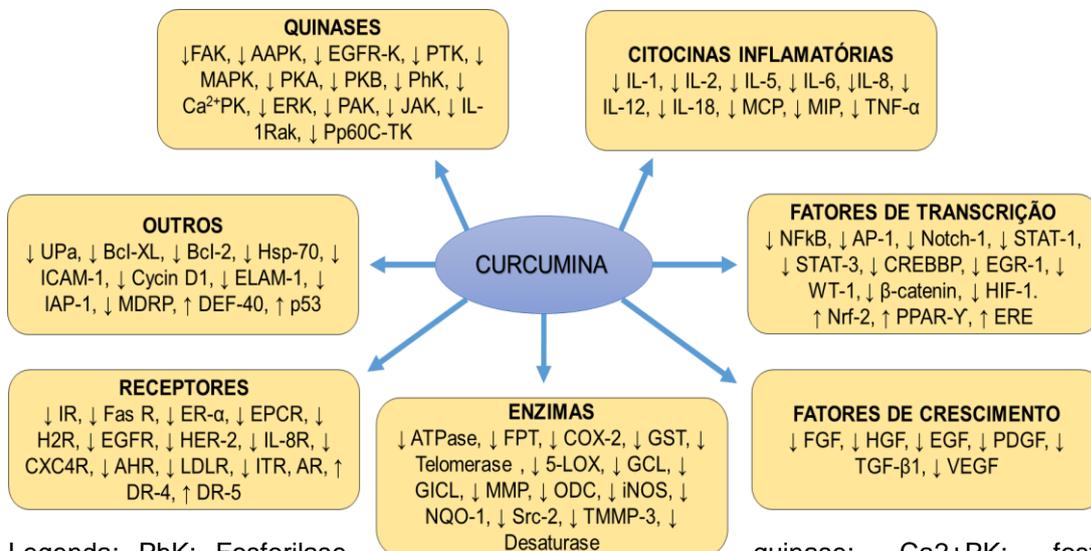
Em trabalhos relacionados com a progressão do câncer colorretal (MCFADDEN et al., 2016), que trabalhou com ratos administrados com uma dietas à base de curcumina aumentou consideravelmente a sobrevida e diminuiu a relação peso/comprimento do cólon, sendo que em 0,5% eliminou totalmente a carga tumoral. Outros achados associam *Curcuma* à *ginkgo biloba*, no tratamento de ratos. Essa associação diminuiu consideravelmente os níveis de MPO, metaloproteinases da matriz, NO, hidroxiprolina e TNF- α (MOTAWI; RIZK; SHEHATA, 2012). Outros achados demonstram que a terapêutica com cúrcuma, em pacientes portadores de DII, causa efeito positivo, mesmo associação com o tratamento medicamentoso convencional, como no uso da curcumina associada à 5-ASA, nesses casos os

pacientes obtiveram respostas clínica e endoscópica superiores ao grupo placebo, quando utilizavam 3 g por dia. Já quando associada ou não à mesalazina, houve uma diminuição da secreção de citocinas pró-inflamatórias. Nesse estudo, a combinação de mesalamina com curcumina produziu resultados semelhantes aos observados com curcumina administrada sozinha (LANG et al., 2015).

Um ensaio clínico randomizado, conduzido no Japão, confirmou que a suplementação oral de 2 g/d de curcumina associada à terapêutica farmacológica foi mais efetiva na redução da colite ulcerativa do que o uso dos fármacos associados ao placebo (HANAI et al., 2006). Mais recentemente, em 2016, outro grupo japonês, também em um estudo randomizado, avaliou a ação de 3 g/d de curcumina (cápsula) por 1 mês e observou melhoras nos achados endoscópicos. Contudo, é importante frisar as diversas limitações descritas pelos autores como, por exemplo, a dificuldade em estabelecer uma dose efetiva, devido ao reduzido número de estudos com esse polifenol e DII (LANG et al., 2015).

Uma recente revisão publicada por Sreedhar e colaboradores, 2016, sobre o potencial terapêutico da curcumina nas DII, confirma a intrínseca correlação existente entre a disfunção na barreira epitelial do intestino, estresse oxidativo e apoptose (mediados pelos mediadores JNK – cJun N-terminal quinase e proteína p53 mutante), e inflamação (mediada pelo fator nuclear kappa B - NF-κB). Os autores trazem ainda uma discussão acerca do papel da curcumina, através de diversas vias celulares, que incluem inibição do NF-κB, regulação imunológica, inibição de enzimas envolvidas com a geração de EROs e ERNs e inibição da peroxidação lipídica (Figura 12). Estudos demonstram que a curcumina pode inibir até 82% da peroxidação lipídica (PL). Este dado demonstra o papel fundamental na supressão da inflamação e inibição de PL importantes no controle da evolução de doenças cardíacas e câncer (PAWAR et al., 2011; SHOME et al., 2016; SIVIERO et al., 2015). Estas publicações reforçam o potencial terapêutico da curcumina para o tratamento das DII.

Figura 12 – Alvos moleculares modulados pela curcumina.



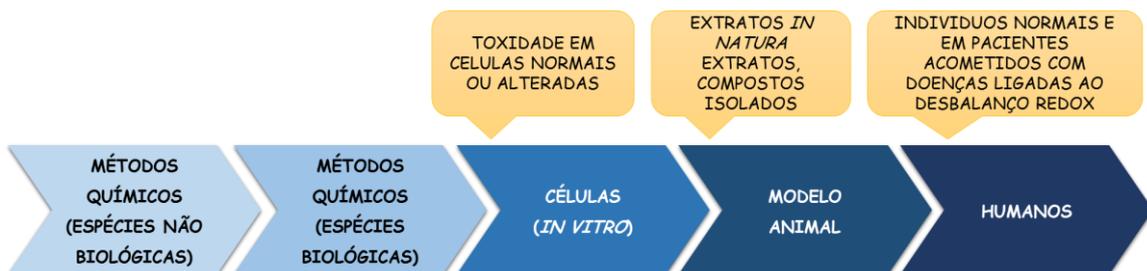
Legenda: PhK: Fosforilase
 Ca²⁺ERK: Quinases reguladas pelo sinal extracelular; PAK: Serina / treonina-proteína quinase; JAK: Janus quinases; IL-1Rak: Gene da quinase associado ao receptor da interleucina-1; Pp60C-TK: tirosina quinase Pp60C; FAK: Quinase de adesão focal; AAKP: Grupo quinase Atípico; EGFR-K: receptor de fator de crescimento epidérmico; PTK: proteína-tirosina-quinases; MAPK: Proteíno-quinases ativadas por mitógeno; PKA: proteína quinase A; PKB: proteína quinase B; IL-1: interleucinas-1; IL-2: interleucinas-2; IL-5: interleucinas-5; IL-6: interleucinas-6; IL-8: interleucinas-8; IL-12: interleucinas-12; IL-18: interleucinas-18; TNF-α: fator de transcrição tumoral-α; MIP: media do IP de todos os sítios de todos os dentes; MCP: Proteína Quimioatraente de Monócitos; NFkB: fator de transcrição nuclear kappa b; AP-1: Proteína ativadora 1; Notch-1: Proteína homóloga neurocirúrgica do locus 1; STAT-1: Transdutor de sinal e ativador de transcrição 1; STAT-3: Transdutor de sinal e ativador de transcrição 3; CREBBP: C- proteína de ligação ao estimulador b ; EGR-1: fator de crescimento da epiderme-1; WT-1: Produto de gene supressor de tumor 1; β-catenin: Catenina- β; HIF-1: Fator Induzível por Hipóxia1; Nrf2: fator de transcrição nuclear; PARY: Receptor nuclear peroxissomo ativado por proliferador GAMMA; FGF: fator de Crescimento Derivado de Plaquetas; HGF: *fator de crescimento* de hepatócito; EGF: fator de Crescimento Fibroblástico; PDGF: fator de Crescimento Derivado de Plaquetas; TGFβ1: Fator de transformação do crescimento beta; VEGF: fator de crescimento endotelial vascular; ATPase: adenosinatrifosfatases; FPT: ferroportina; COX2: Ciclo-oxigenase-2; GST: glutationa transferase; Telomerase: dicionar sequências específicas e repetitivas de DNA; 5LOX: 5-lipoxigenase; GCL: Ligasa glutamato-cisteína; MMP: Metaloproteínase matriz; ODC: Ornitina decarboxilase; iNOS: óxido nítrico sintase induzível; NQO1: quinona oxidoreductase 1; Src-2: domínios homólogos 2; Desaturase: remove dois átomos de hidrogênio de um ácido graxo; IR: receptor de insulina; ERα: Receptor de estrogênio alfa; EPCR: Complexo endotelial receptor proteína C; EGFR: Expressão do *receptor* do fator de crescimento epitelial; HER2: Fator de crescimento epidérmico humano Receptor-tipo 2; IL8R: receptor de interleucina 8; CXC4R: Receptor de quimiocina C-X-C tipo 4; AHR: Receptor de hidrocarbonetos arílicos; LDLR: O receptor de lipoproteína de baixa densidade; ITR, AR; DR-4: Receptor de morte 4; DR-5: Receptor de morte 5; Upa: Ativador do plasminogênio tipo uroquinase; Bcl-XL: Linfoma de células B extra grande; Bcl-2: Linfoma de células B 2; Hsp-70: proteínas de choque térmico de 70 quilo Dalton; ICAM-1: Molécula de Adesão Intercelular 1; Cycin D1: proteína que em humanos é codificada pelo gene; p53: proteína citoplasmática, de massa molecular 53 kDa.

Fonte: Adaptado de Shome et al, (2016).

3.10 Justificativa

Um fator fundamental na escolha de *Curcuma longa* para uso como extrato natural preventivo e terapêutico, em modelos animais de CUI quimicamente induzidos, sua disponibilidade em termos de cultivo, inclusive no Brasil, sua segurança como medicamento e a inesgotável busca por novas ações e pelo conhecimento de seus mecanismos moleculares de ação (Quadros 1 e 2, Figura 12) (UNG et al., 2015). O grupo de pesquisa do laboratório de eletroquímica e estresse oxidativo (LEEO) que possui experiência nas 3 primeiras fases da Figura 13, em relação à curcumina (CAMATARI et al., 2018), já se tem estabelecidos, os modelos animais de colite ulcerativa leve, moderada e grave (MOURA et al., 2016) e trabalha suplementação anti-oxidante (MOURA et al., 2016) (fase 4 da figura 13). A sequência natural seria a utilização da curcumina nos modelos animais já estabelecidos (Fase 4), como preparação para a fase mais importante, a fase 5: ensaios clínicos (Figura 13). Nesse contexto reside a importância do presente trabalho. Além disto, existem muitas indefinições na literatura, especialmente relacionadas às ações extraintestinais da curcuma. É fundamental conhecer sua atividade em órgãos importantes como o eixo intestino-cérebro ou intestino-fígado-cérebro, por exemplo.

Figura 13 – Evolução do processo metodológico.



Fonte: De Araujo, O. R. P.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais

4.1.1 Reagentes

Os reagentes: albumina bovina sérica (PTn), epinefrina, tartarato duplo de sódio e potássio tetra-hidratado ($\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$), ácido 5,5'-bisditionitro-2-nitrobenzóico (DTNB), 1,1,3,3-tetrametoxipropano (TMP), catalase, reagente de Folin-Ciocalteu e 2,4-dinitrofenilidrazina (DNPH) foram adquiridos da Sigma-Aldrich Brasil Ltda; Ácido clorídrico (HCl); ácido tiobarbitúrico (TBA), J.T. Baker; fosfato de sódio monobásico (NaH_2PO_4), fosfato de sódio dibásico (Na_2HPO_4), hidróxido de sódio (NaOH), etanol ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$) da Vetec Química Fina LTDA; ácido tricloroacético 25% (TCA) e ureia ($(\text{NH}_2)_2\text{CO}$), Dinâmica Química Contemporânea LTDA ; peróxido de hidrogênio (H_2O_2) da Synth; sódio dodecil sulfato (SDS), SSD (MW 36,000-40,000 Da) foi adquirido da MP Biomedicals®. LiChrolut®, RP-18 P foi obtido da Merck S.A., Rio de Janeiro, RJ. Brasil, os comprimidos do cocktail de inibidor de protease foram provenientes da Roche Diagnóstica Brasil Ltda. O tampão RIPA (10X) foi obtido da Cell Signaling Technology. O pó de *C. longa* (açafração-da-terra) foi adquirido em março de 2015, da Cooperativa dos Produtores de Açafração de Mara Rosa e o extrato farmacêutico (ExtFarC) foi obtido em abril de 2015, da FAGRON DO BRASIL; dieta controle elaborada pela Rhoster (são paulo, Brasil), de acordo com a dieta padrão para roedores proposta pelo *American institute of nutrition*, versão AIN-93M.

4.1.2 Equipamentos

Agitador magnético AP 55, Phoenix, biofreezer VIP Serie Sanyo, espectrofotômetro UV/vis Thermo Scientific, microscópio óptico (Nikon 600N) acoplado a uma máquina digital Nikon 4500, UO126, Promega Corporation (Madison, WI, USA); GÖ6983 and SB203580, Merck Biosciences (Darmstadt, Germany), H89, Biomol, cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) acoplado à detecção UV-Vis (Shimatzu, Serial no. L201550).

4.1.3 Preparação dos extratos do pó de *Curcuma longa*

Esta parte do trabalho foi feita em conjunto com a Dra. Fabiana Camatari e consta de sua tese de doutorado (CAMATARI, 2016).

Os extratos do pó de *C. longa*, de cor amarela, foram preparados por meio da técnica de extração em aparelho do tipo Soxhlet, como descrito por De Oliveira et al. (2009), com modificações. Vários pacotes de 100 g foram abertos, misturados mecanicamente e, dessa mistura, foram retiradas as respectivas massas. Inicialmente, foram realizadas extrações-teste para definir o melhor tempo de extração, sendo comparadas extrações por 6 horas e por tempo adequado até a amostra tornar-se límpida. A extração foi feita utilizando solvente apolar (hexano) e solvente polar (metanol), em sequência. Foram pesados 20 g de pó de *C. longa*, colocados em um cartucho poroso apropriado de celulose na câmara do extrator de Soxhlet. Em seguida, foram medidos 150mL de hexano e colocados em um balão de fundo redondo, que foi acoplado ao extrator. A extração foi seguida por 6h, a 68 °C. O material extraído foi colocado em um rota-evaporador (Buchi equipamentos) a 68°C, para eliminação do solvente, e o extrato foi então transferido para um vidro âmbar e armazenado sob refrigeração, dando origem ao extrato hexânico de *C. longa* (CH6).

Este mesmo procedimento foi repetido, utilizando o mesmo cartucho utilizado para a extração com hexano, fazendo-se uso do metanol a 64,7°C por 6 h, dando origem ao extrato metanólico de *C. longa* (CHM6), após adequada destilação do solvente. Em procedimento semelhante, utilizando outra amostra de *C. longa*, foi realizada extração, por tempo necessário até que a amostra torna-se límpida no cartucho poroso, utilizando hexano, inicialmente por 6 h e, em seguida, metanol no mesmo cartucho, dando origem ao extrato CHML no final do procedimento. O

procedimento de extração foi repetido realizando-se a extração apenas com metanol, seguindo o mesmo procedimento, em temperatura de ebulição do metanol (64,7°C), por 6 h e até que a amostra se tornasse límpida, dando origem aos extratos metanólicos de *C. longa*, CM e CML.

Em seguida, após definição do tempo de extração, as extrações definitivas foram feitas utilizando solvente apolar (hexano) e solventes polares: metanol e etanol. O procedimento de extração foi realizado da mesma forma como anteriormente descrito, utilizando-se 6 h de extração. Foram pesados 20 g de pó de *C. longa*, colocados em um cartucho poroso apropriado de celulose, na câmara do extrator de Soxhlet. Em seguida, foram medidos 150 mL de hexano e colocados em um balão de fundo redondo, que foi acoplado ao extrator. A extração foi seguida por 6 h, a 68 °C. O material extraído foi colocado em um rota-evaporador (Buchi) a 68 °C, para eliminação do solvente; o extrato foi então transferido para um vidro âmbar e armazenado sob refrigeração, levando ao extrato hexânico de *C. longa* (CH). Esse procedimento foi repetido, utilizando o mesmo cartucho utilizado para a extração com hexano, fazendo-se uso do metanol a 64,7 °C por 6 h, dando origem ao extrato metanólico de *C. longa* (CHM). Da mesma forma obteve-se o extrato metanólico (CM), seguindo-se o mesmo procedimento, utilizando-se outra amostra com a mesma quantidade e mesmo volume de solvente, porém, sem utilizar a etapa hexânica. O extrato etanólico foi obtido da mesma forma, utilizando-se apenas etanol, em refluxo, no processo de extração, na temperatura de ebulição do etanol, a 78,4°C (CE). Os extratos obtidos, juntamente com o extrato farmacêutico (ExtFarC) (CAMATARI et al., 2016).

4.2 Métodos

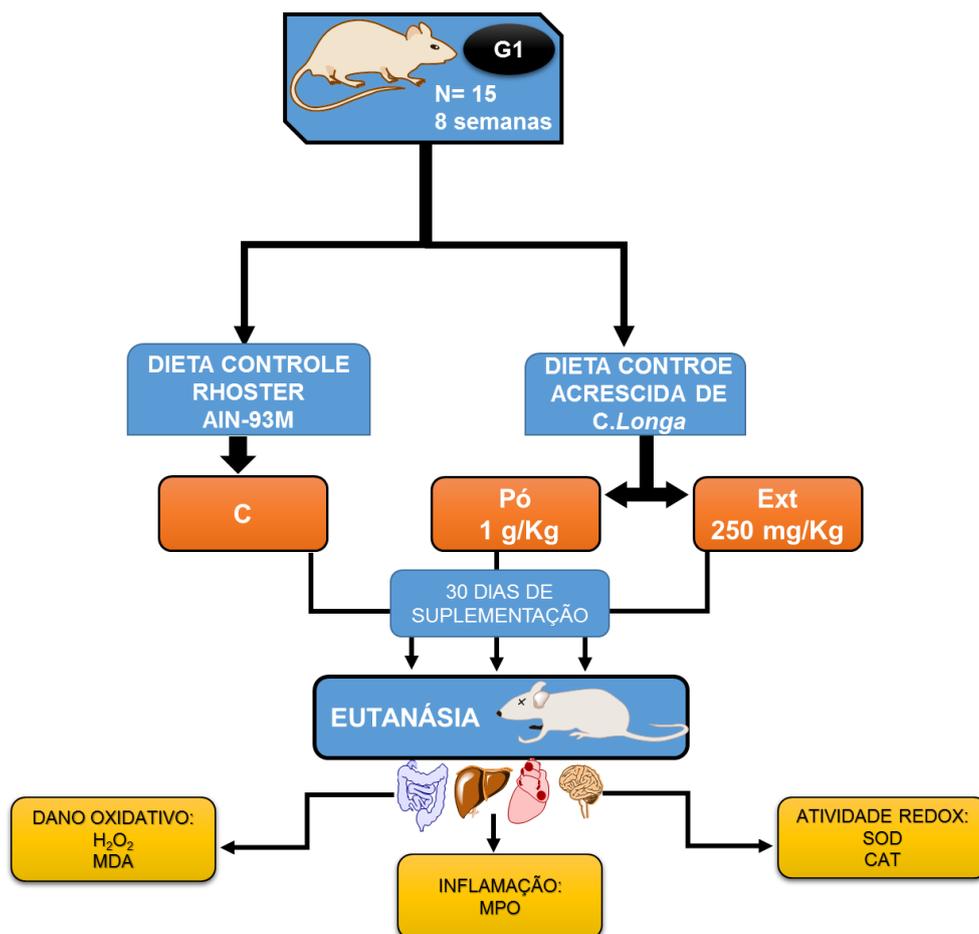
4.2.1 – Fase experimental *in vivo* – Animais Saudáveis (Fase G1) e animais induzidos à colite ulcerativa moderada (Fase G2).

Nas figuras 14 encontra-se representado o fluxograma da fase G1, 15 camundongos machos *Swiss*, com 8 semanas de nascidos, provenientes do Biotério Central da UFAL, foram agrupados em gaiolas de polietileno (n=5), devidamente randomizados de acordo com o peso corporal, com as seguintes denominações: grupo controle (C), grupo pó de açafração (Pó) e grupo extrato farmacêutico de açafração

(Ext). Os animais permaneceram no Biotério Setorial da Faculdade de Nutrição da Universidade Federal de Alagoas (24 ± 1 °C; ciclo claro/escuro de 12 h), por 30 dias (estudo agudo) (Figura 15). Os animais do grupo controle foram submetidos à dieta comercial AIN 93 (C), e os demais grupos receberam, dieta enriquecida com pó de açafrão (1 g/kg de peso da ração) ou com extrato de açafrão que contem 4X mais curcuminoides em relação ao pó de açafrão (250 mg/kg peso da ração), confeccionadas a partir da dieta controle, segundo o grupo de tratamento.

As dietas foram processadas pela RHOSTER® numa peletizadora à temperatura média de 70-80°C e, em seguida, os peletes foram secos em estufa ventilada por 2 h, à temperatura média de 65 °C. A composição das dietas pode ser visualizada no quadro 3.

Figura 14 – Fluxograma da fase experimental *in vivo* – Animais saudáveis (Fase G1).



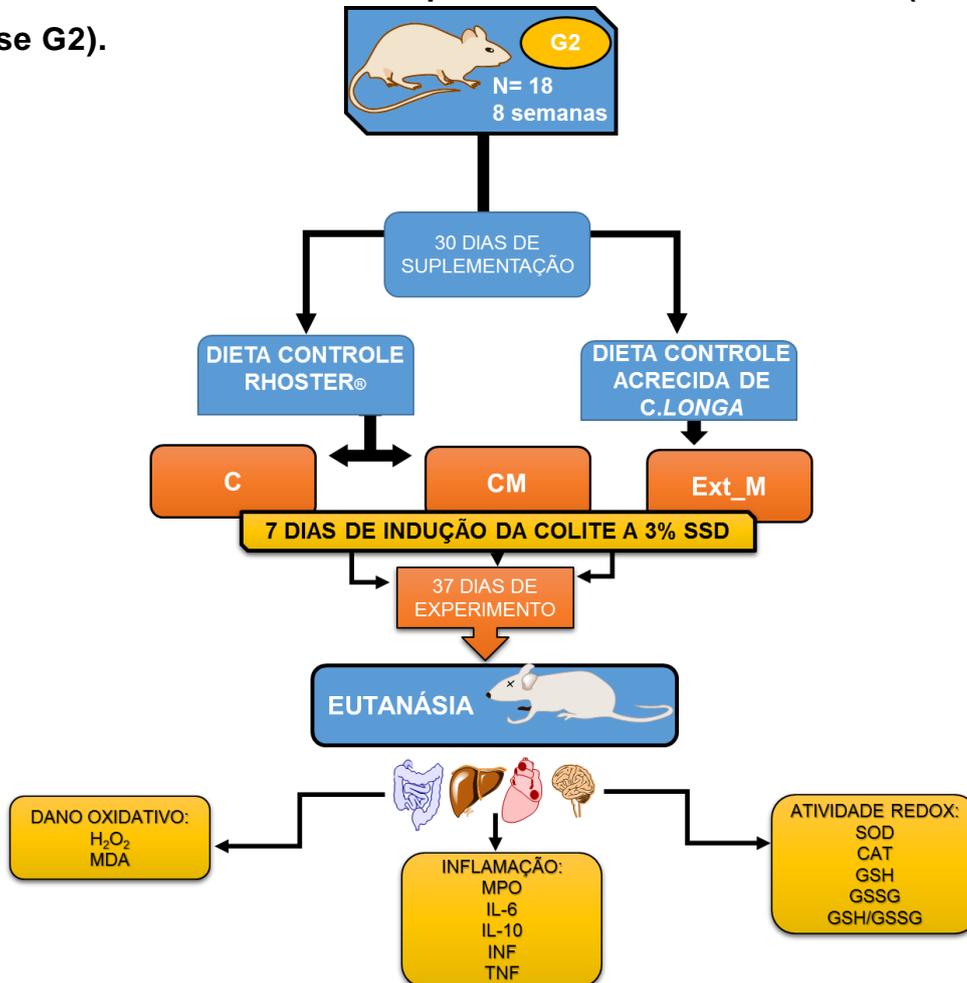
Legenda: CAT: catalase; C: controle; Ext: controle enriquecido com *Curcuma* em extrato farmacêutico; H₂O₂: peróxido de hidrogênio; MDA: malondialdeído; SOD: superóxido dismutase e Pó: controle enriquecido com curcuma em pó.

Fonte: DE ARAUJO, O. R.

Nas figuras 16 encontra-se representado o fluxograma da fase G2, 18 camundongos machos *Swiss*, com 8 semanas de nascidos, provenientes do Biotério Central da UFAL, foram agrupados em gaiolas de polietileno (n=6), devidamente randomizados de acordo com o peso corporal, com as seguintes denominações: grupo controle (C), grupo controle moderado (CM) e grupo extrato moderado (Ext_M). Os animais permaneceram no Biotério Setorial da Faculdade de Nutrição da Universidade Federal de Alagoas (24 ± 1 °C; ciclo claro/escuro de 12 h), por 37 dias (estudo agudo) (Figura 16). Os animais dos grupos controle e controle moderado foram submetidos à dieta comercial AIN-93M (C) (RHOSTER®) e os animais do grupo Ext_M receberam dieta enriquecida com extrato de açafrão (250 mg/kg peso da ração), confeccionada a partir da dieta controle.

As dietas foram processadas pela RHOSTER® numa peletizadora à temperatura média de 70-80°C e, em seguida, os peletes foram secos em estufa ventilada por 2 h, à temperatura média de 65 °C. A composição das dietas pode ser visualizada no quadro 3.

Figura 15 – Fluxograma da fase experimental *in vivo* – Animais com colite ulcerativa moderada induzida por sulfato de sódio dextrana (SSD a 3% - p/v) (Fase G2).



Legenda: C= controle; CM= controle moderado; Ext_M= extrato de curcuma farmacêutico moderado; SOD = superóxido dismutase; H₂O₂ = peróxido de hidrogênio; CAT = catalase; MDA = malondialdeído; GSH = glutatona reduzida; GSSG = glutatona oxidada; GSH/GSSG = razão entre a forma reduzida e a oxidada; MPO = mieloperoxidase; IL = interleucina; INF = interferon gama e TNF = fator de necrose tumoral.

Fonte: De Araujo, O. R. P.

Quadro 3 – Composição das dietas experimentais baseadas na dieta AIN-93M¹.

COMPOSIÇÃO	DIETA COMERCIAL	DIETA COMERCIAL COM EXTRATO FARMACÊUTICO DE CURCUMA	DIETA COMERCIAL COM PÓ DE CURCUMA
Total de energia	0,003 kcal/kg	0,003 kcal/kg	0,003 kcal/kg
Proteína	25,14 kcal%	25,14 kcal%	25,14 kcal%
Carboidratos	61,93 kcal%	61,93 kcal%	61,93 kcal%
Lipídios	12,93 kcal%	12,93 kcal%	12,93 kcal%
Umidade (máx)	10,29%	10,29%	10,29%
Proteína Bruta (min)	21,25%	21,25%	21,25%
Extrato Etéreo (min)	6,57%	6,57%	6,57%
Matéria Mineral (min)	8,35%	8,35%	8,35%
Cálcio (máx)	1,23%	1,23%	1,23%
Fósforo (min)	1,01%	1,01%	1,01%
Sódio	2 g	2 g	2 g
Lisina	0,82 g	0,82 g	0,82 g
Metionina	0,3 g	0,3 g	0,3 g
Cistina	0,29 g	0,29 g	0,29 g
Extrato farmacêutico de curcuma (g/kg), contendo curcumina	-	250mg/kg	-
Pó de curcuma (g/kg), conteúdo os curcuminoídes	-	-	1g/kg

Fonte: ¹Elaborada por RHOSTER®, são Paulo, Brasil.

4.2.2 Estimativa da ingestão alimentar

A ingestão alimentar foi avaliada semanalmente durante todo o período experimental. O cálculo do consumo alimentar foi baseado na diferença de peso entre a ração ofertada em gramas e a sobra desta em gramas; essa estimativa é feita sobre

a média de consumo global do grupo com (n = 5) fase G1 ou (n = 6) fase G2, menos o seu rejeito global.

4.2.3 Glicemia de jejum

Após jejum noturno de 12 horas, os camundongos tiveram sua glicemia de jejum aferida por meio da coleta de sangue via veia caudal, utilizando-se um glicosímetro portátil, de acordo com as especificações do fabricante. Essa mensuração foi realizada no 1º e último dia (31º) fase G1, e (37º) fase G2 do experimento antes da eutanásia.

4.2.4 Eutanásia e coleta dos órgãos

Ao final dos períodos experimentais, fases G1 e G2, após jejum noturno de 12 horas, os camundongos foram anestesiados (40mg/kg de tiopental), via intraperitoneal, no quadrante inferior direito, e submetidos à coleta de sangue por punção cardíaca (eutanásia). Após a realização da perfusão ventricular com solução de heparina a 2%, foram retirados o intestino grosso, lavado com soro fisiológico para a retirada de possíveis resquícios de fezes, o fígado, o coração e o cérebro, que foram imersos em solução salina a 0,9 % e, posteriormente, pesados em balança analítica, para obtenção e registro do peso absoluto/peso relativo. Em seguida, foram cortados em pedaços e pesados com massa específica, 25, 50 e 100 mg, e transferidos para microtubos previamente etiquetados, para serem armazenados em freezer a -80 °C. A porção final do intestino grosso foi separada e imediatamente armazenada em solução de bouin (solução tampão contendo 10% de formol), onde permaneceram por 24hs, quando foram transferidas para recipientes contendo álcool 70%, para posterior processamento histológico.

As carcaças foram colocadas em sacos plásticos escuros adequados, lacrados e encaminhados para o descarte, o qual é realizado por equipe responsável pela coleta de lixo de material biológico e químico na UFAL. Os materiais perfuro cortantes foram armazenados em recipientes apropriados e levados para descarte no Hospital Universitário Professor Alberto Antunes (HUPAA).

4.2.5 Preparação dos extratos teciduais

Na preparação dos homogeneizados do intestino, fígado, coração e cérebro foram utilizados tampão RIPA (do inglês *Radioimmunoprecipitation assay buffer*) (pH 7,4) (em uma proporção de 1:9, ou seja, o volume do solvente nove vezes a massa

do tecido) e o *cocktail* de inibidor de protease (um comprimido para 50 mL de tampão RIPA), visando inibir a ação de proteases intracelulares e preservar a integridade das proteínas e outros componentes celulares. Os extratos de intestino, por sua vez, foram obtidos, utilizando-se nitrogênio líquido, tendo como objetivo a desintegração do tecido para facilitar a maceração. Após macerado, o pó resultante foi transferido para microtubos e o volume correspondente ao peso do órgão foi adicionado, isto significa que o volume em mL será 9X de acordo com o peso do órgão em mg, sendo essa solução posteriormente homogeneizada com o auxílio do vórtex. Em seguida, todos os extratos teciduais foram centrifugados a 12.000 rpm, durante 20 min, a 4°C. O sobrenadante foi retirado e por fim, aliquotado e armazenado a -80°C, para posteriores análises bioquímicas.

4.3 Análise histológica

O segmento tecidual do intestino, fase G2, destinado às análises histológicas foi submetido a uma sequência pré determinada de banhos com álcoois em concentrações diversas (70%, 80%, 90% e 100%), xilol e parafina. Em seguida, as peças histológicas foram cortadas (5µm) com auxílio de micrótomo e fixadas em lâminas de histologia.

As lâminas foram então coradas com hematoxilina e eosina (HE), para avaliação de alterações na microarquitetura dos órgãos. Os cortes foram fotografados em microscópio óptico.

4.4 Análises bioquímicas

4.4.1 Dosagem de proteínas teciduais para as duas fases G1 e G2

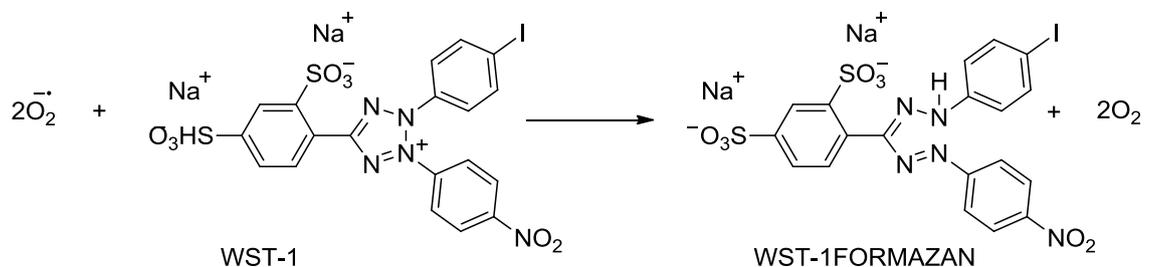
Baseia-se no método proposto por Bradford et al. (1976). Para preparação das amostras, realizaram-se diluições, com o objetivo de normalizar o conteúdo proteico de cada tecido, de 1:10 para o intestino e o cérebro, e de 1:20 para o coração e fígado, utilizando o tampão fosfato (PBS) (50 mM, pH 7,4). Em seguida, a solução preparada foi agitada com o auxílio de vórtex para homogeneizar. A partir disso, 20 µL da amostra/padrões da curva (BSA) (1 a 5 mg dL⁻¹) foram pipetados, em duplicata, nos poços da microplaca (visível), seguida da adição de 200 µL de reagente de Bradford, aguardando 5 min (protegido da luz). Após esse tempo, a leitura foi feita em espectrofotômetro a 595 nm (BRADFORD et al., 1976).

4.4.2 Determinação dos marcadores de capacidade antioxidante fases G1 e G2

4.4.3 - Superóxido dismutase (SOD)

Inicialmente, os extratos de intestino, coração, cérebro e fígado foram diluídos, para normalizar o conteúdo enzimático, (1:20, 1:10, 1:10 e 1:80, respectivamente) com tampão PBS 50mM, pH 7,4. A atividade foi mensurada utilizando o Kit SOD Assay – WST, de acordo com informações do fabricante. O método é baseado na inibição em 50% da redução do WST-1 formazan pela SOD, o qual é formado a partir da reação entre o WST-1 e o $O_2^{\cdot-}$ (Figura 18), detectada em 450nm. A atividade da SOD foi expressa como percentual (%) de taxa de inibição $mg\ prote\acute{a}na^{-1}$.

Figura 16 – Reação entre o ânion radical superóxido e o WST-1, formando o WST-1 formazan.



Fonte: De Araujo, O. R. P.

4.4.4 - Catalase (CAT), fases G1 e G2

A determinação da atividade da CAT foi realizada de acordo com o método descrito previamente por Aebi 1984. A taxa de redução na absorvância, a 240 nm, foi utilizada como índice de decomposição do H_2O_2 pela CAT. Uma unidade de CAT foi considerada como a quantidade de enzima necessária para decompor $1\ \mu\text{mol}/\text{min}$ de H_2O_2 , a $37\ ^\circ\text{C}$. Primeiro, foram pipetados $7,5\ \mu\text{L}$ dos homogenatos intestinal, cardíaco, cerebral e hepático (diluição de 1:30 para o coração e fígado, com tampão PBS 20 mM, pH 7,0), em duplicata, seguido da adição de $187,5\ \mu\text{L}$ de tampão PBS (pH 7,0); os demais tecidos não sofrem diluição. Posteriormente, a leitura foi realizada em espectrofotômetro a cada 15 s, durante 5 min, a um comprimento de onda de 240 nm, sendo o resultado considerado o branco. Em seguida, $5\ \mu\text{L}$ de H_2O_2 ($1\ \text{mol}\ L^{-1}$) foram adicionados, com a leitura sendo novamente realizada a cada 15 s, durante 5 min. Todos os resultados foram expressos em U de CAT mg.

Cálculo para a concentração de catalase:

$$\text{Catalase U/mg proteína} = \frac{2,361 \times 0,67 \times (\text{ABSi} - \text{ABSf})}{\text{ABSi} \times \text{mg de proteína}}$$

ABS i = Absorvância inicial;

ABS f = Absorvância final;

0,67 = fator de correção do método da cubeta em relação à placa, caminho óptico;

mg de proteína = quantidade de proteína (em mg) pipetada no poço.

4.4.5 - Determinação dos níveis de glutathiona reduzida (GSH) e glutathiona oxidada (GSSG), fases G1 e G2

O conteúdo de GSH total e GSSG foi avaliado a partir da técnica descrita por Tripple e Rogers (2012), como modificações. Inicialmente, a proteína total foi precipitada após centrifugação do homogenato tecidual (1.400 rpm por 10 min a 20 ° C) com ácido metafosfórico 5% (g/v) na proporção de 1:1.

Na sequência, a GSH total e a GSSG foram medidas. Para obter GSH, o sobrenadante do homogeneizado sem proteínas foi diluído (1:20 intestino e cérebro; 1: 200 fígado e coração) em tampão de ensaio (PBS 0,1 M + EDTA 5 mM, pH 7,4). Em seguida, 30 µL (cólon) ou 150 µL (fígado) foram transferidos para a microplaca de leitura. Para o cólon, completou-se o volume final (150 µL) com tampão de ensaio. A reação foi então iniciada adicionando-se 50 µL da mistura de reação 1 (5,5'- dithiobis- (ácido 2-nitrobenzoico) – DTNB – 10 mM; e GR – 4.2 U.mL⁻¹) e 50 µL da mistura de reação 2 (NADPH 1% g/v).

Para medida da GSSG, 50 µL do homogenato tecidual desproteínizado foi diluído em tampão de ensaio (1:50) contendo 5 µL de *N*-etilmaleimida (NEM) e centrifugado a 12.000 rpm por 20 min (20°C). Essa solução foi então incubada por 50 min para completa complexação da NEM com a GSH. Para excluir esse complexo (NEM-GSH), evitando assim a inativação da glutathiona redutase (GR) a ser adicionada na reação, utilizou-se uma coluna de filtração. Em seguida, 200 µL desse eluente foi transferido para microplaca de leitura sendo então adicionados 50 µL da mistura de reação 1 e 50 µL da mistura de reação 2.

Em ambas as análises, a absorvância foi medida em espectrofotômetro, comprimento de onda de 412 nm, em uma cinética de 3 min com leituras a cada 30 seg. As concentrações foram então obtidas após comparação dos resultados obtidos após realização de curva de calibração padrão com concentrações conhecidas de GSSG. Os resultados foram expressos em nM.mg Ptn⁻¹. Para cálculo da GSH, utilizou-se a seguinte equação:

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

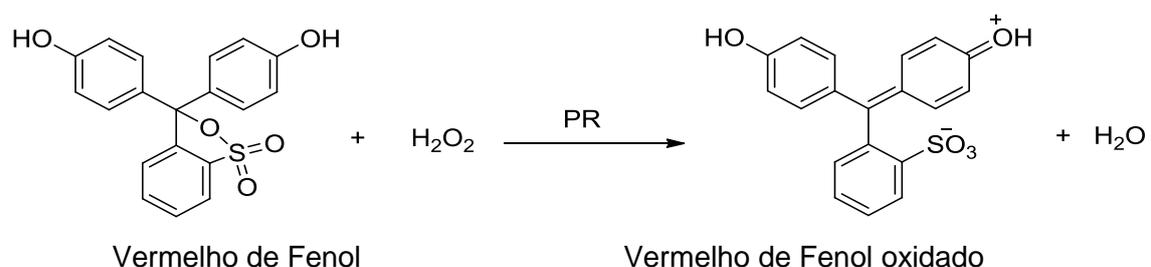
4.4.6 Avaliação da produção de espécies pró-oxidantes para as fases G1 e G2

4.4.6.1 - Peróxido de Hidrogênio (H₂O₂)

A concentração foi determinada por meio da adaptação do método colorimétrico de Pick; Keisari, 1980. O princípio da técnica consiste na oxidação do vermelho de fenol pelo H₂O₂, mediada pela peroxidase de rabanete (Figura 19). A concentração de H₂O₂ foi expressa em nmol mg de proteína⁻¹, de acordo com a curva de calibração previamente estabelecida. Inicialmente, os homogenatos do intestino, coração, cérebro e fígado foram adicionados em microtubos contendo tampão de ensaio (tampão fosfato, dextrose e NaCl (1:25) (pH 7,0)).

Em seguida, foram adicionados 5µL de vermelho de fenol (0,028 M) e 4,25 µL de peroxidase de rabanete (PR) (1 KU/mL). Os microtubos com a solução foram então incubados a 37°C, durante 30 min. Após esse período, 200 µL das amostras foram transferidas, em duplicata, para uma microplaca de leitura (visível), contendo 25 µL de hidróxido de sódio (1 M). A leitura foi realizada em espectrofotômetro, no comprimento de onda de 610 nm. A concentração de H₂O₂ foi expressa em nmol mg de proteína⁻¹, de acordo com a curva de calibração previamente estabelecida (Figura 19).

Figura 17 – Reação entre o H₂O₂ e o vermelho de fenol.



Legenda: PR: peroxidase de rabanete

Fonte: DE ARAUJO, O. R.

4.5 Determinação da atividade inflamatória para as fases G1 e G2

4.5.1 Determinação dos níveis do fator de necrose tumoral alfa, interferon gama e interleucina 6 e 10

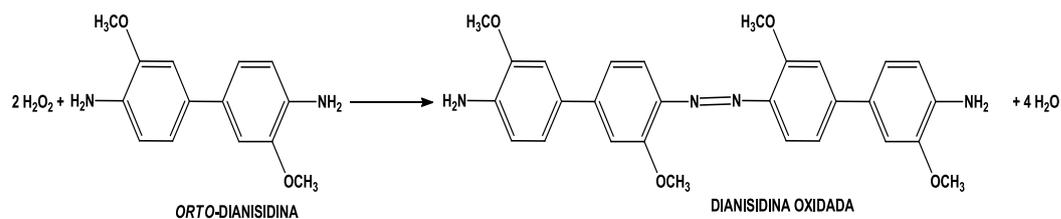
A produção de citocinas e quimiocinas nos sobrenadantes de amostras de intestino, fígado, coração e cérebro foi quantificada por Milliplex MAP Painel de citocinas/ quimiocinas para camundongos (Merck Millipore®), seguindo as instruções do fabricante. Os resultados foram expressos em pg mg de Ptn⁻¹.

4.5.2 - Mieloperoxidase (MPO)

A mensuração, Figura 20, da atividade da MPO foi realizada por meio da adaptação do método proposto por Bradley et al, (1982).

Resumidamente, 25 mg dos tecidos intestinal, renal e cerebral foram homogeneizados, utilizando tampão de ensaio (tampão de fosfato de potássio - 50 mM, 0,5% de brometo de hexadeciltrimetilamônio e EDTA - 5 mM- pH 6,0). Em seguida, as soluções foram centrifugadas a 4.000 rpm, por 15 min, a 4 °C. Após essa etapa, o sobrenadante foi retirado e centrifugado novamente a 12.000 rpm, por 15 min, a 4 °C. Posteriormente, 50 µL do sobrenadante foram transferidos em duplicata para uma microplaca e adicionados 50 µL de solução de *orto*-dianisidina (0,68 mg/mL). A microplaca foi incubada a 37 °C por 15 min e, em seguida, foram adicionados 50 µL de solução de H₂O₂ (0,3%). Uma nova incubação foi realizada (37 °C) e após 10 min, a leitura foi feita em espectrofotômetro, em comprimento de onda de 460 nm. Uma unidade de MPO foi definida como a quantidade de H₂O₂ (em µmol) decomposta por minuto. Os resultados foram expressos em U de MPO mg de proteína⁻¹ (BRADLEY; CHRISTENSEN, 2018).

Figura 18 – Reação entre o peróxido de hidrogênio e a *orto*-dianisidina.



Fonte: De Araujo, O. R. P.

4.6 Determinação de marcador de dano oxidativo para as fases G1 e G2

4.6.1- Malondialdeído (MDA)

Os níveis de MDA foram mensurados por meio de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), acoplada à detecção por UV a 270 nm. Os parâmetros para o sistema de HPLC usados foram os seguintes: coluna 5C18 (150 mm x 4,6 mm) acoplado com pré-coluna (45 mm x 4,6 mm), fase móvel composta por acetonitrila HPLC/UV e tampão Trizma (pH 7,4) (1:9).

A técnica é baseada no método adaptado por Vickie, Changchit e Chow (1990). As amostras foram previamente preparadas, com 25 mg dos tecidos intestinal, cardíaco, cerebral e hepático homogeneizados com 400 µL de tampão Trizma-Base (pH 7,4), 40 µL de solução antioxidante de butil-hidroxitolueno (BHT) e 440 µL de acetonitrila. Em seguida, o homogenato foi centrifugado a 3.500 rpm, por 10 min, a 4 °C e o sobrenadante foi filtrado por meio de um filtro com membrana durapore de 0,22 µm de poro. O volume de 20 µL do filtrado foi injetado no HPLC e a leitura realizada a 270 nm. A duração total da leitura é de 6 min, onde o tempo de retenção do MDA é em torno de 2'51". Os valores de MDA foram avaliados a partir da curva padrão, utilizando 1,1,3,3-tetrametoxipropano (TMP), que é um composto precursor de MDA, e expressos em nM MDA.mg de tecido⁻¹, sendo posteriormente corrigidos para o peso em miligrama (mg) do tecido analisado, obedecendo o fator de correção, de acordo com a seguinte equação:

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

4.7 Análise estatística

Para verificar a distribuição normal, foi utilizado o teste de *Kolmogorov-Smirnov*. Variáveis paramétricas foram avaliadas usando a análise unidirecional emparelhada de variância (ANOVA), seguida do teste de *Tukey/teste* de Bonferroni para as comparações entre os grupos. Utilizou-se ainda o teste t para análise entre 2 grupos. O teste de *Kruskal-Wallis* 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).

4.8 Submissão do projeto

O projeto foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da UFAL, vinculado ao Conselho Nacional de Saúde do Ministério da Saúde (ANS/MS/Brasil), tendo sido aprovado sob o número do processo 45/2016, Anexo 1, baseado em 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

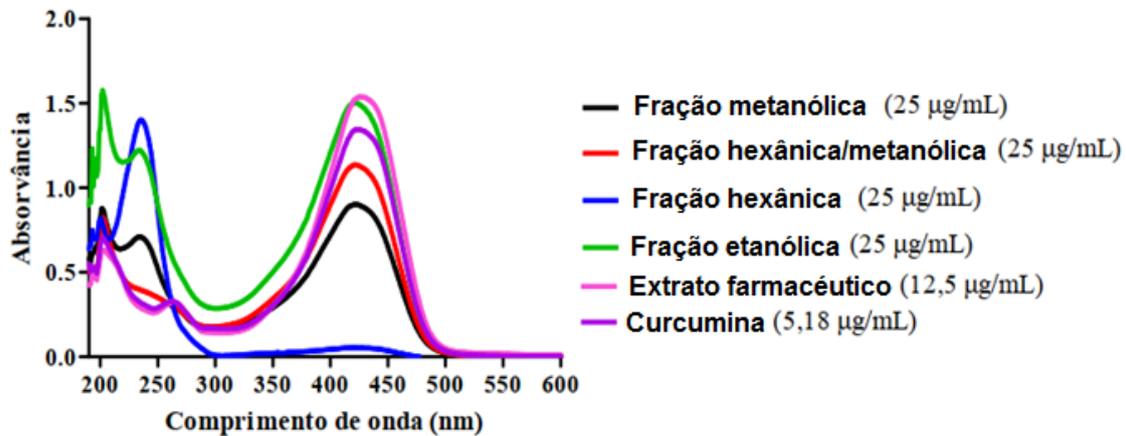
Os dados serão discutidos em três etapas: análise química do extrato farmacêutico e do pó de *Curcuma longa*; 1ª fase experimental (G1) (Figura 14), quando os testes de desequilíbrio redox foram realizados em animais saudáveis; e 2ª fase experimental (G2), quando houve a indução da colite ulcerativa moderada e a utilização do extrato farmacêutico da *Curcuma longa*, administrado por via oral (dieta).

5.1 Etapa 1: Identificação e quantificação dos curcuminóides por CLAE-UV dos extratos de *Curcuma longa*, esta parte do trabalho foi feita em conjunto com a Dra. Fabiana Camatari e consta de sua tese de doutorado (CAMATARI, 2016).

A análise do perfil químico foi necessária para relacionar as atividades aos compostos presentes nos extratos. Os extratos de *Curcuma longa* metanólico (CM), extrato de *Curcuma longa* fração Hexânica e metanólica (CHM), extrato de *Curcuma longa* etanólico (CE) e extrato farmacêutico de *Curcuma longa* (ExtFarC), todos obtidos após 6 h de refluxo e por tempo suficiente até a amostra se tornar límpida, foram analisados via espectrofotometria e observou-se a formação de um pico com banda larga e intensa, que apresentou comprimento de onda em torno de 425 nm, característica dos curcuminóides (CAMATARI et al., 2016). Esta característica é atribuída as transições que ocorrem entre orbitais de fronteira, elétrons (π) ligantes e antiligantes (π^*), $\pi \rightarrow \pi^*$, de acordo com a literatura (VAN NONG et al., 2016), semelhante ao espectro no UV-Vis da curcumina, também apresentado na Figura 21.

O espectro do extrato da fração hexânica/metanólica (CHM) apresentou banda com menor intensidade nesse comprimento de onda. O extrato da fração etanólica (CE) apresentou maior absorvância em 425 nm, em relação aos extratos fração hexânica/metanólica e fração metanólica (CM), sugerindo uma maior concentração dos constituintes, indicando que a extração dos curcuminóides com etanol é mais eficiente. O extrato farmacêutico (ExtFarC) apresentou absorvância similar à fração etanólica, mesmo possuindo concentração inferior aos demais extratos analisados, indicando uma maior concentração de curcuminóides neste extrato, em relação aos outros extratos estudados (CAMATARI et al., 2016).

Figura 19 – Espectros de absorção no UV-Vis dos extratos de *Curcuma longa* e da curcumina.



Fonte: Camatari et al, 2016.

Nas Figuras 22 são apresentados os cromatogramas obtidos a partir de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) dos padrões, referentes aos extratos derivados do pó de *C. longa* Figura 23 a 27. Os picos mostrados nos cromatogramas foram identificados por meio de comparação com padrões autênticos mostrados na Figura 18. Os extratos analisados foram identificados três curcuminóides: a bisdesmetoxicurcumina, que apareceu com tempo de retenção de 19 min, a desmetoxicurcumina, em 22 min, e a curcumina, em 26 min Figura 22. Em relação a composição em curcuminóides, observa-se que os extratos CM, CHM e CE apresentaram os três curcuminóides Figuras 23, 24 e 26 respectivamente; o extrato CH continha somente desmetoxicurcumina e curcumina Figura 25, enquanto o ExtFarC apresentou apenas curcumina na sua composição Figura 27.

Figura 20 – Cromatograma dos curcuminóides padrões: (A) bisdesmetoxicurcumina, (B) desmetoxicurcumina e (C) curcumina, em 425 nm.

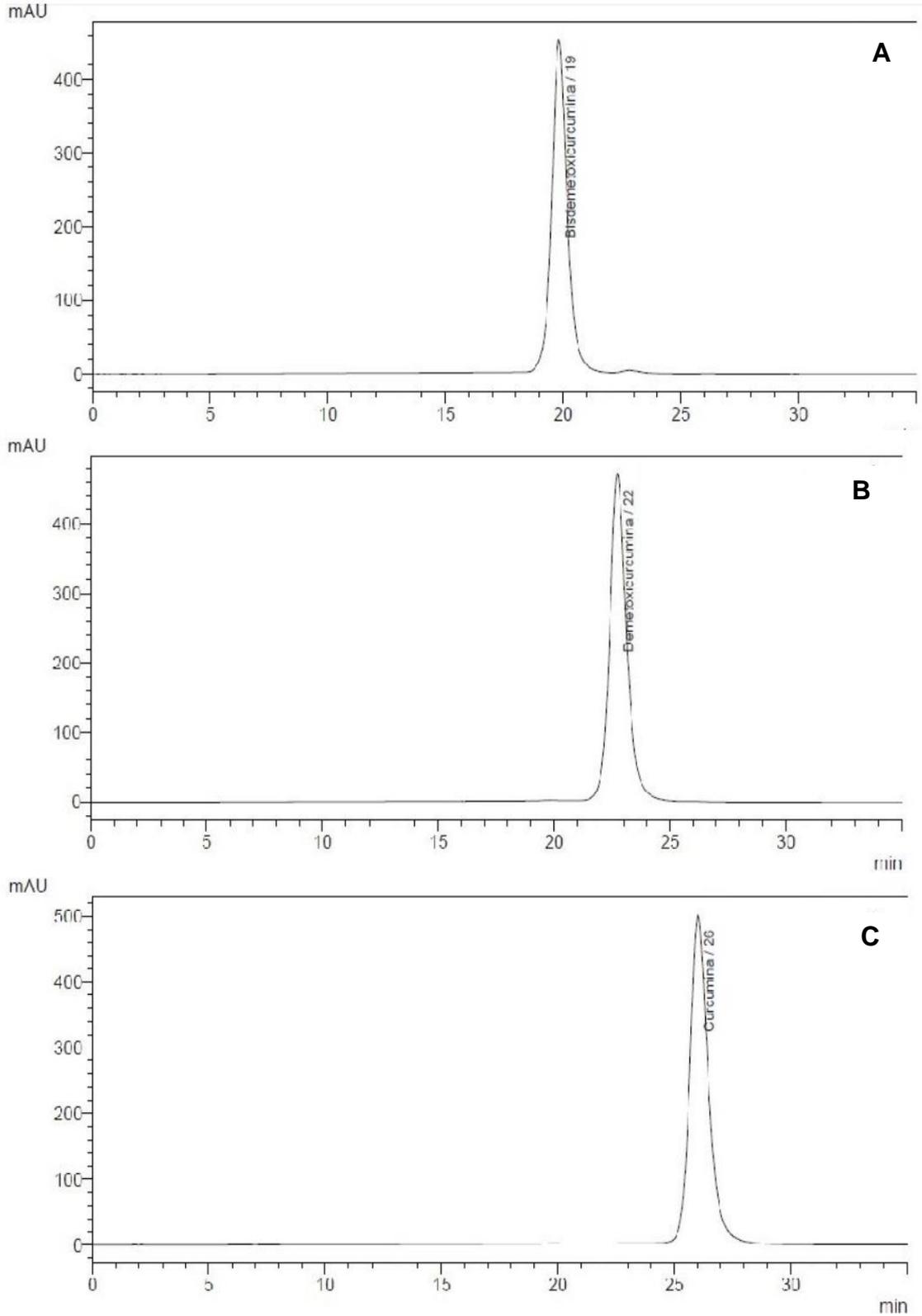


Figura 21 – Cromatograma do extrato fração metanólica de *Curcuma longa* (CM). Picos correspondem a: 1, bisdesmetoxicurcumina; 2, desmetoxicurcumina; 3, curcumina, em 425 nm.

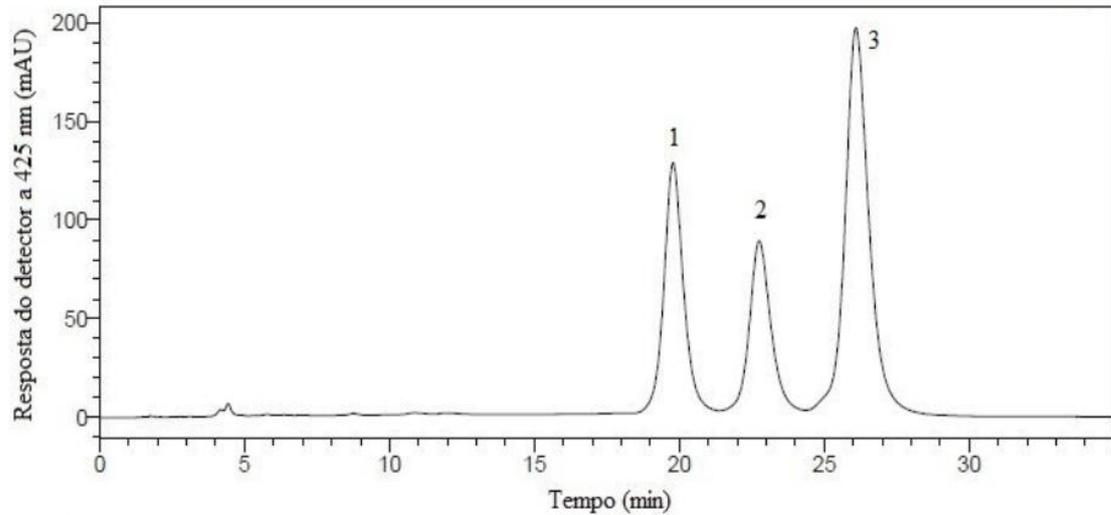


Figura 22 – Cromatograma do extrato fração hexânica/metanólica de *Curcuma longa* (CHM). Os picos correspondem a: 1, bisdesmetoxicurcumina; 2, desmetoxicurcumina; 3, curcumina, em 425 nm.

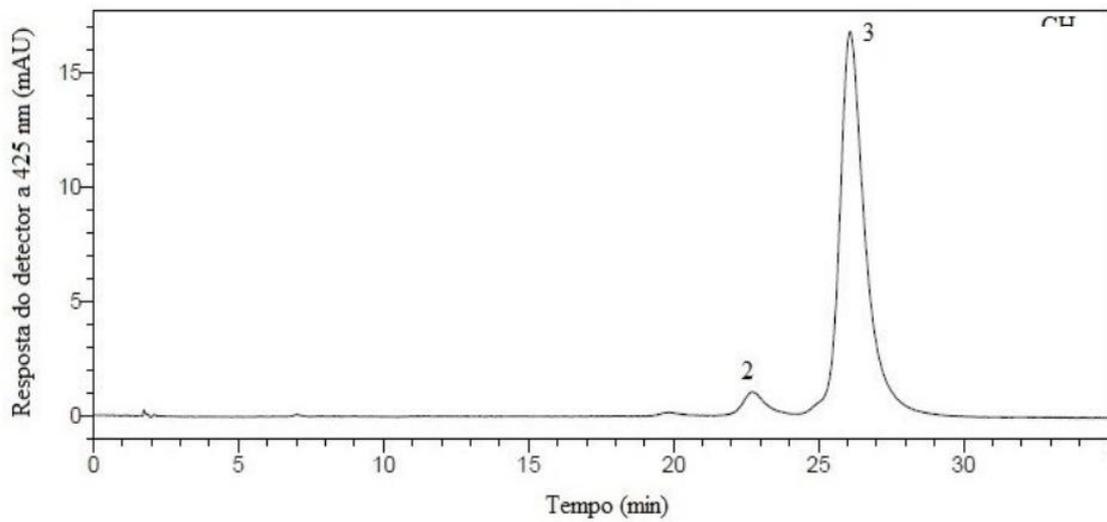


Figura 23 – Cromatograma do extrato fração hexânica de *Curcuma longa* (CH). Picos correspondente a: 2 desmetoxicurcumina; 3 curcumina, em 425 nm.

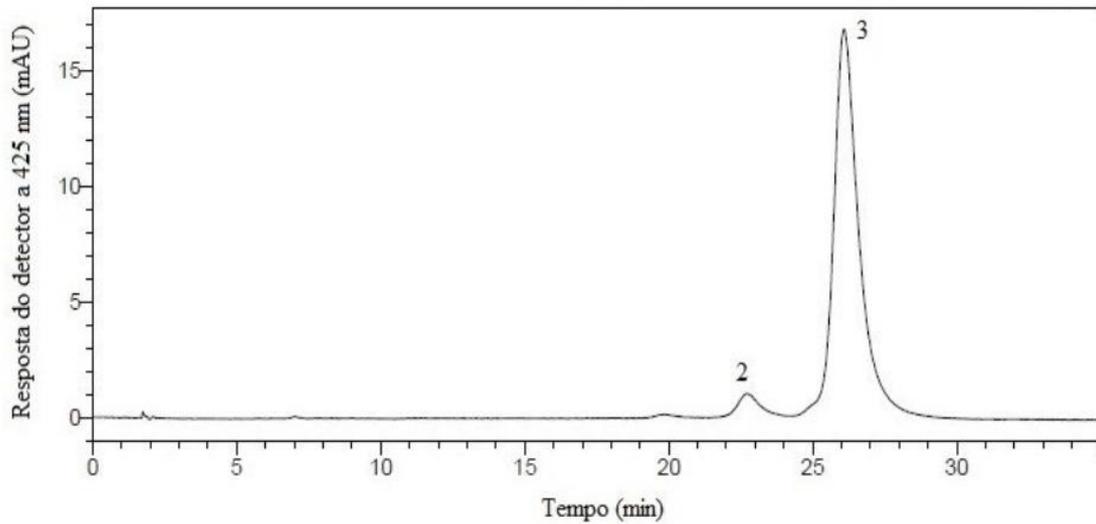


Figura 24 – Cromatograma do extrato fração etanólica de *Curcuma longa* (CE). Picos correspondem a :1 bisdesmetoxicurcumina; 2 desmetoxicurcumina; 3 curcumina, em 425 nm.

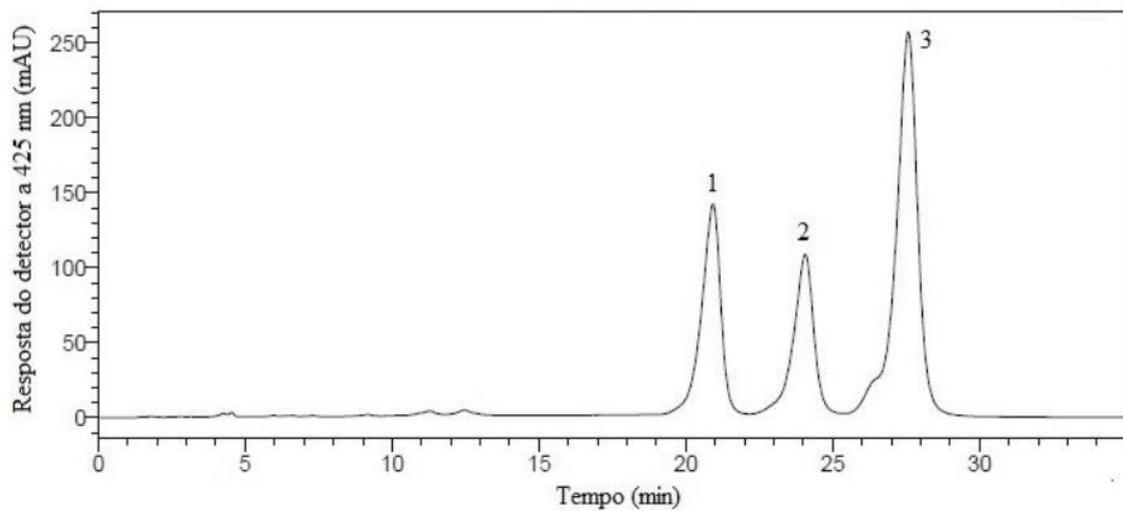
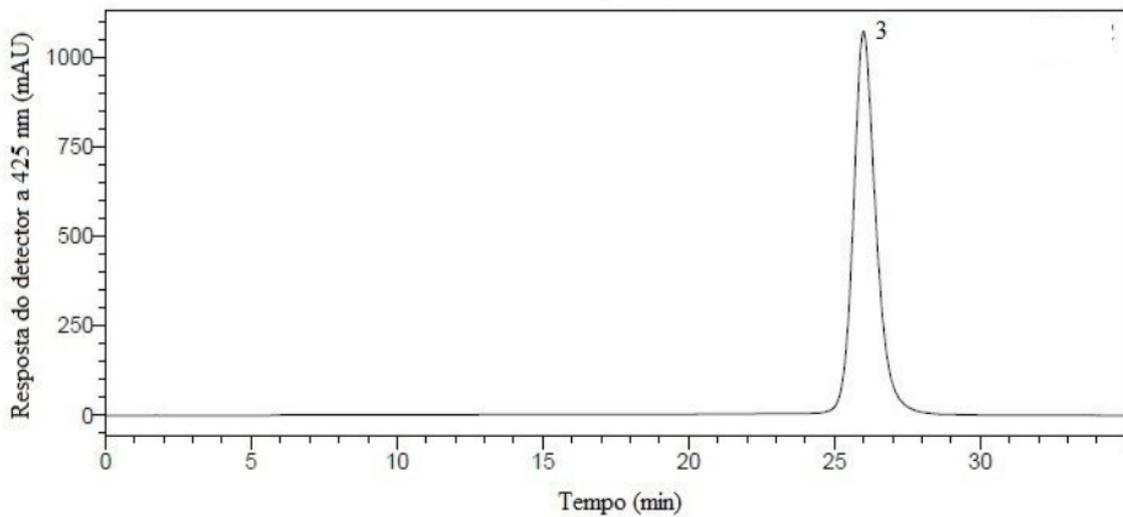


Figura 25 – Cromatograma CLAE-UV do extrato farmacêutico de *Curcuma Longa* (ExtFarC). Pico corresponde: 3 curcumina, em 425 nm.



O Quadro 4 lista a quantidade destes compostos nos extratos. Nos extratos CM, CHM e CE, a curcumina está presente em maior quantidade (247,43 - 265,20 mg/g de extrato), seguido pela bisdesmetoxicurcumina (100,80 - 109,71 mg/g) e, em menores quantidades, a desmetoxicurcumina (66,11 mg/g de extrato). O extrato CH apresentou as menores quantidades de desmetoxicurcumina e curcumina, em 3,40 e 47,35 mg/g de extrato, respectivamente. A partir destes resultados, pode-se confirmar que metanol e etanol são mais eficientes na extração dos três curcuminoides que o hexano. O extrato farmacêutico mostrou em sua composição a presença majoritária de curcumina, 654,47 mg/g de extrato, apresentando, assim, maior conteúdo de curcumina (total de curcuminoides presentes) que os extratos CE, CM, CHM e CH, obtidos do pó da *C. longa*.

Quadro 4 – Quantificação dos extratos de *C. longa* por CLAE, com detecção a 425nm.

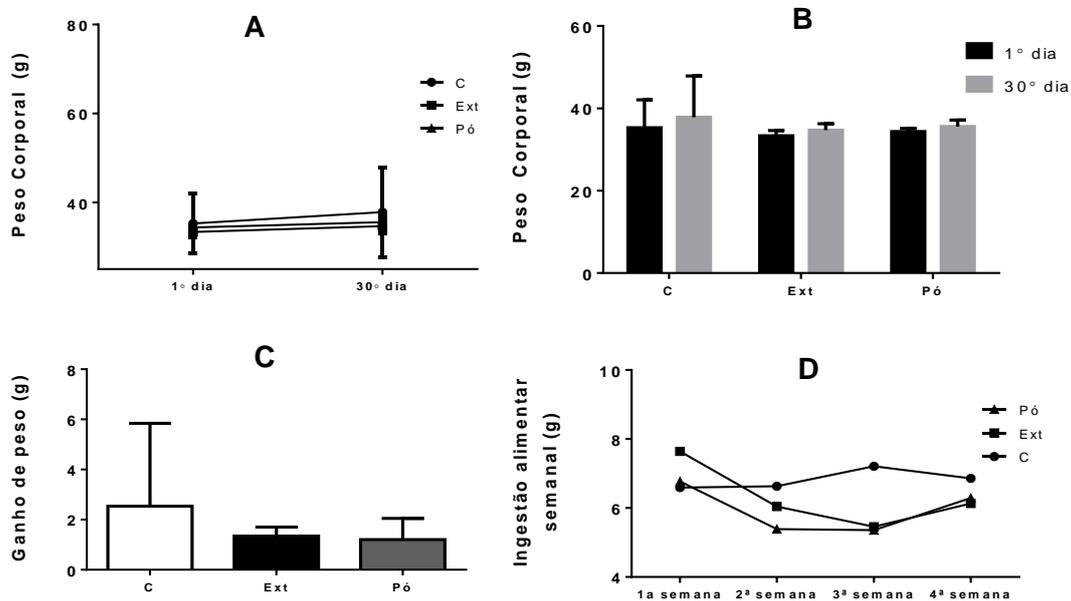
COMPOSTO	Equação da regressão linear pela área	CM (mg/g)	CHM (mg/g)	CH (mg/g)	CE (mg/g)	ExtFarC (mg/g)
BISDESMETOXICURCUMINA	$y = 68755[c] - 82526$ $R^2 0,9999$	102,48	109,71	ND	100,80	ND
DESMETOXICURCUMINA	$y = 80287[c] - 75831$ $R^2 0,9997$	66,11	68,72	3,40	69,10	ND
CURCUMINA	$y = 54110[c] - 85570$ $R^2 0,9998$	249,12	247,43	47,35	265,20	654,47
TOTAL DE CURCUMINOIDES		417,71	425,86	50,75	435,10	654,47

Legenda: [c] concentração do curcuminoides em mg/g de extrato. ND Não detectado.

5.2 Avaliação da biometria e dosagem glicêmica

Com relação a avaliação de ganho de peso corporal realizada na fase 1 (Figura 26) percebe-se que não houve diferenças nos pesos intergrupos (Figura 28A), e intragrupos (Figura 28B), nem no ganho de peso (Figura 28C) ou ingestão alimentar (Figura 28D), comparativamente ao início e ao final do tratamento, indicando que não houve influência da curcuma (extrato farmacêutico e pó) sobre a evolução ponderal dos animais.

Figura 26 – Peso corporal (A e B), ganho de peso (C) e ingestão semanal de ração (D) dos animais saudáveis (n= 5), fase G1 de acordo com grupo e o período de tratamento.

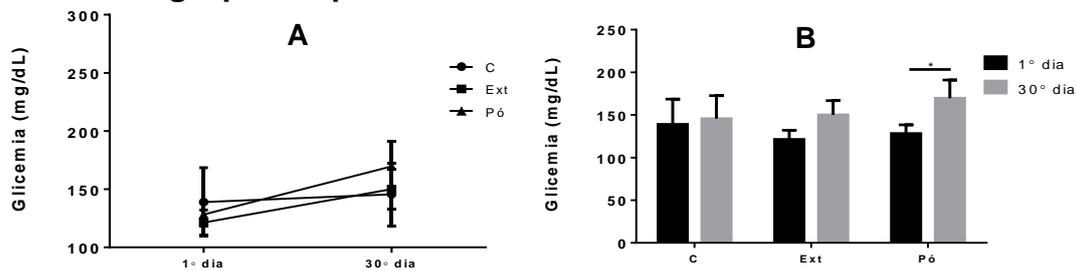


Legenda: C – grupo controle; Ext – grupo tratado com extrato farmacêutico de curcuma; e Pó – grupo tratado com pó de curcuma.

Fonte: De Araujo, O. R. P.

Nessa fase também foi avaliada a influência da curcuma (pó e extrato) sobre a glicemia dos animais. Percebe-se que não houve diferenças nas glicemias intergrupos, no 1º e 30º dia tratamento (Figura 29A). Por outro lado, ao realizar a comparação intra grupos (1º vs 30º dia experimental), verifica-se que o grupo Pó apresentou uma elevação significativa em sua glicemia (Figura 29B), indicando um potencial hiperglicêmico do tratamento.

Figura 27– Glicemia de jejum dos animais saudáveis (n= 5), fase G1 de acordo com grupo e o período de tratamento.



Legenda: C – grupo controle; Ext – grupo tratado com extrato farmacêutico de curcuma; e Pó – grupo tratado com pó de curcuma. * $p < 0,05$ segundo teste t

Fonte: De Araujo, O. R. P.

Diferentemente desses achados, alguns estudos indicam um efeito hipoglicemiante da curcumina em grupos isolados, observado especialmente em modelos animais induzidos ao diabetes (WONGEAKIN et al., 2009). Esses dados sugerem que esta redução dos níveis de glicose promovida pela curcumina pode ocorrer apenas quando a glicemia se encontra acima dos valores metabolicamente normais. Contudo, é importante salientar, que no grupo Pó foi utilizada a forma em pó da curcuma, que apresenta outros componentes que podem estar influenciando negativamente nesse controle, uma vez que não houve mudança na ingestão ou ganho de peso em nenhum dos grupos.

A Tabela 1 traz a avaliação dos pesos absolutos e relativos dos órgãos, segundo o grupo de tratamento. Percebe-se que não houve alterações nesses parâmetros.

Tabela 1– Pesos absoluto e relativo do cólon, fígado, coração, cérebro e baço dos animais saudáveis, fase G1 segundo o grupo estudado (média ± EP) (G1).

	GRUPO CONTROLE (n= 5)	GRUPO EXTRATO (n= 5)	GRUPO PÓ (n= 5)
CÓLON (g)	0,354 ± 0,046	0,340 ± 0,012	0,371 ± 0,023
RAZÃO CÓLON/PESO CORPORAL	0,009 ± 0,0007	0,009 ± 0,0004	0,010 ± 0,0004
FÍGADO (g)	1,482 ± 0,135	1,316 ± 0,073	1,424 ± 0,064
RAZÃO FÍGADO/PESO CORPORAL	0,039 ± 0,001	0,037 ± 0,001	0,040 ± 0,001
CORAÇÃO (g)	0,200 ± 0,010	0,212 ± 0,013	0,186 ± 0,016
RAZÃO CORAÇÃO/PESO CORPORAL	0,005 ± 0,0003	0,006 ± 0,0002	0,005 ± 0,0004
CÉREBRO (g)	0,292 ± 0,008	0,289 ± 0,012	0,298 ± 0,024
RAZÃO CÉREBRO/PESO CORPORAL	0,008 ± 0,0008	0,008 ± 0,0003	0,008 ± 0,0007
BAÇO (g)	0,454 ± 0,083	0,576 ± 0,030	0,604 ± 0,042
RAZÃO BAÇO/PESO CORPORAL	0,012 ± 0,002	0,016 ± 0,0008	0,016 ± 0,001

Legenda: C – grupo controle; Ext – grupo tratado com extrato farmacêutico de curcuma; e Pó – grupo tratado com pó de curcuma fase G1.

Fonte: De Araujo, O. R. P.

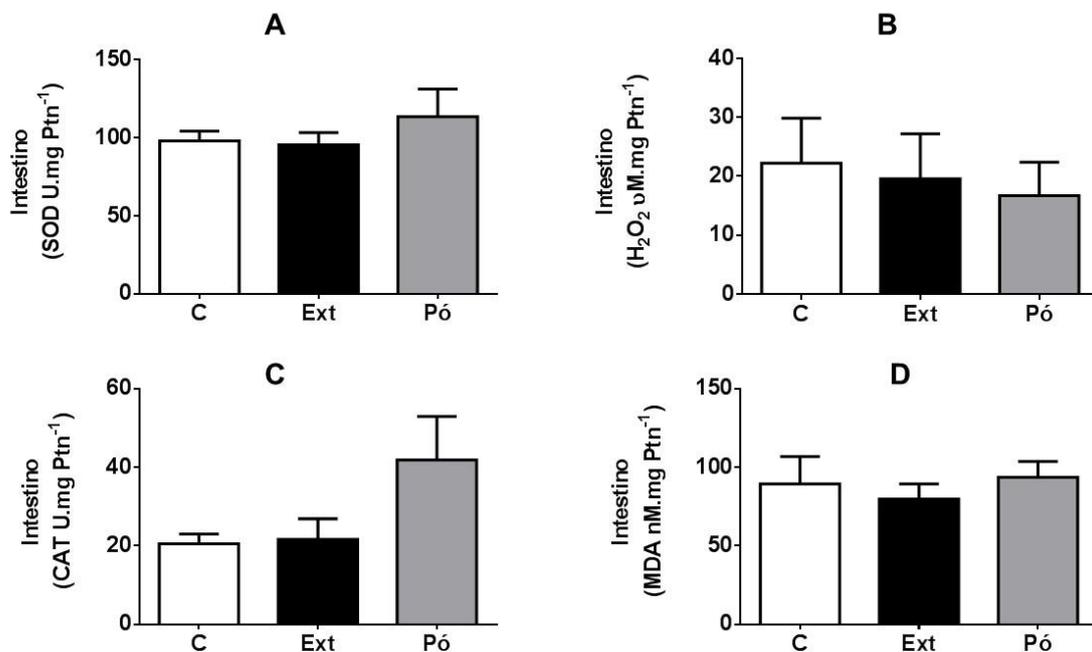
O perfil oxidativo dos animais, na fase G1 em diferentes tecidos foi obtido a partir da análise de alguns marcadores de dano oxidativo – MDA e H_2O_2 – e de defesa antioxidante enzimática – SOD e CAT.

Optou-se por esses marcadores, pois todos são encontrados nos tecidos analisados e representam de forma geral o equilíbrio/desequilíbrio redox, sendo utilizados na grande maioria das pesquisas que investigam estresse nitroxidativo em diversas condições clínicas e patológicas. Além disso, apresentam metodologias padronizadas no presente grupo de pesquisa.

A defesa antioxidante foi analisada através da mensuração dos níveis das enzimas SOD e catalase. Como mencionado anteriormente, a SOD é responsável pela conversão de O_2^{\bullet} em H_2O_2 ; nesse contexto, situações fisiológicas ou patológicas que elevam a formação de O_2^{\bullet} aumentam os requerimentos desta enzima.

Os dados referentes à análise redox colônica podem ser observados na Figura 30.

Figura 28 – Marcadores redox colônicos, segundo o grupo de tratamento: controle (C); extrato farmacêutico de curcuma (Ext); e pó de curcuma (Pó), fase G1, (n= 5).



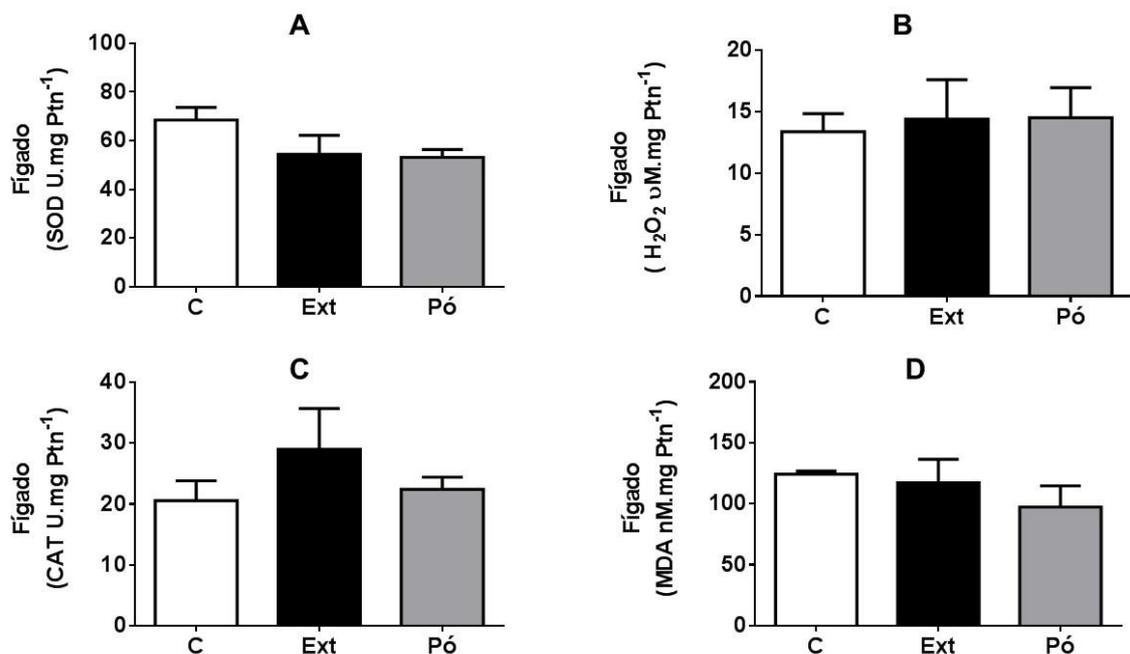
Legenda: SOD (A): superóxido dismutase; H_2O_2 (B): peróxido de hidrogênio; CAT (C): catalase e MDA (D): malondialdeído; fase G1.

Fonte: De Araujo, O. R. P.

De acordo com os biomarcadores analisados, não se observa alteração no perfil redox intestinal, indicando que, nos animais saudáveis, a ingestão de extrato farmacêutico ou pó de curcuma não apresentou efeitos protetores ou adversos, no equilíbrio redox do órgão (Figura 30). A curcuma longa ou curcumina vem sendo amplamente utilizada no restabelecimento da saúde intestinal em diversos modelos animais de colite ulcerativa induzida, polipose, câncer, dentre outros (SINGH; KHAR, 2006; UKIL et al., 2003). Seus efeitos benéficos, especialmente sobre o perfil inflamatório é amplamente observado nesses estudos. Com tudo, diferentemente do adotado nesta pesquisa, não é comum na literatura científica a avaliação desta substância em animais saudáveis, impossibilitando, dessa forma, a comparação dos resultados.

Além do intestino, também foram analisados os marcadores do desequilíbrio redox hepático (Figura 31). Assim como no intestino, não foram observadas mudanças nos biomarcadores no tecido hepático.

Figura 29 – Marcadores redox hepáticos segundo o grupo de tratamento: controle (C); extrato farmacêutico de curcuma (Ext); e pó de curcuma (Pó); fase G, (n= 5).



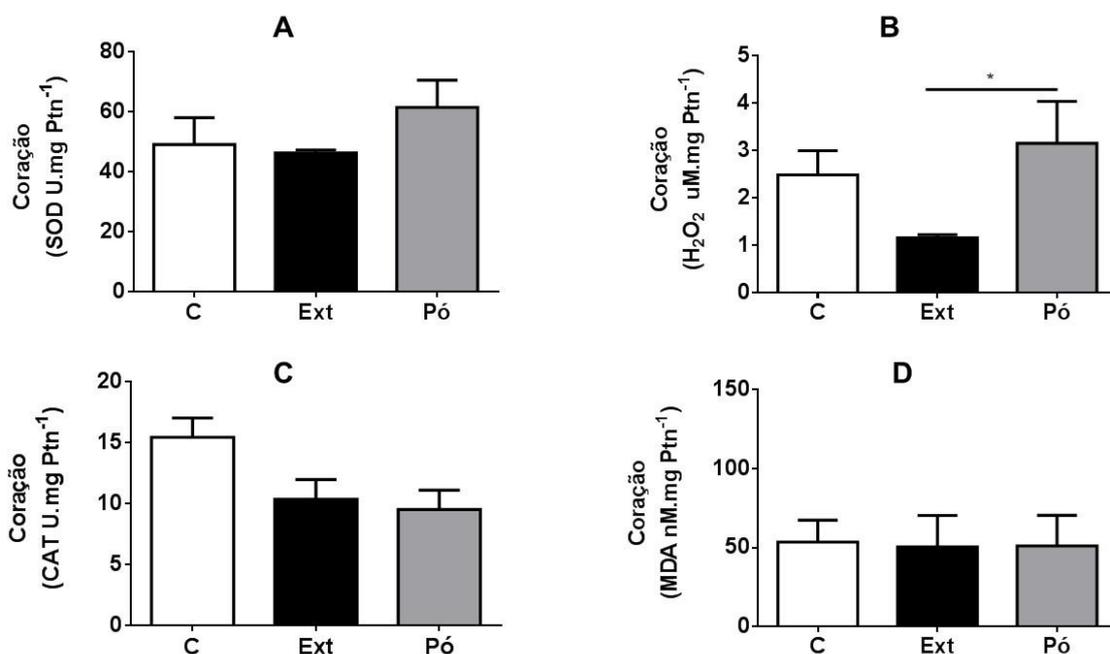
Legenda: SOD (A): superóxido dismutase; H₂O₂ (B): peróxido de hidrogênio; CAT (C): catalase; e MDA (D): malondialdeído; fase G1.

Fonte: De Araujo, O. R. P.

O efeito protetor da curcuma no dano hepático causado por isquemia-reperfusão, toxicidade de diversas etiologias, etc., tem sido amplamente confirmado na literatura (BAVAR SAD et al., 2018; UCHIO et al., 2017). Dentre suas ações benéficas destacam-se a inibição do estresse oxidativo e inflamação, regulação do retículo endoplasmático e a proteção enzimática (LEE et al., 2017; JOSHI et al., 2017; UCHIO et al., 2017). Por outro lado, como discutido para o tecido intestinal, não há disponibilidade de pesquisas que avaliem o efeito da curcuma/curcumina em fígados de animais saudáveis. Mostrando, mais uma vez, o pioneirismo deste estudo.

O desequilíbrio redox também foi investigado no tecido cardíaco (Figura 32).

Figura 30 – Marcadores redox cardíacos, segundo o grupo de tratamento: controle (C); extrato farmacêutico de curcuma (Ext); e pó de curcuma (Pó); fase G1, (n= 5).



Legenda: SOD (A): superóxido dismutase; H₂O₂ (B): peróxido de hidrogênio; CAT (C): catalase e MDA (D): malondialdeído; fase G1.

* $p < 0,05$ segundo o teste de tukey

Fonte: De Araujo, O. R. P.

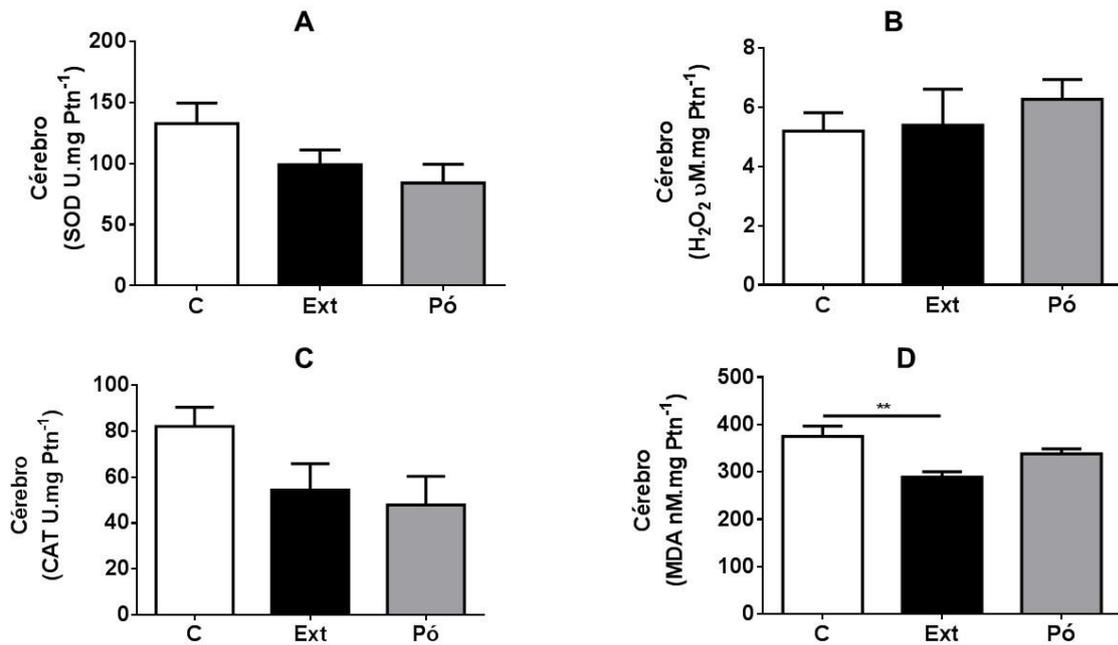
Como pode ser observado as Figuras A, C e D não apresentaram diferenças significativas, já na Figura 32B, o grupo Ext apresentou uma melhor resposta antioxidante, quando comparado ao grupo Pó, sugerindo um efeito cardioprotetor do extrato farmacêutico de *Curcuma longa*. O resultado cardioprotetor da curcumina,

devido ao efeito supressor do estresse oxidativo e à melhora da função ventricular, já foi observado anteriormente em indivíduos com insuficiência cardíaca (Li et al., 2011). Zang et al. (2013) também observaram, tanto em modelos *in vivo* como *in vitro*, que após o estresse induzido por palmitato juntamente com o consumo de uma dieta hiperlipídica, o tratamento com curcumina atenuou significativamente a hipertrofia cardíaca, apoptose e fibrose associada à lesão.

Ainda no estudo de Boonla et al. (2014), a curcumina atenuou o aumento da pressão arterial sistólica e a disfunção endotelial, além de melhorar o remodelamento vascular, em um modelo experimental de hipertensão renovascular (BOONLA et al., 2014). Estes efeitos benéficos foram observados graças à melhoria do estado hemodinâmico, minimização de alteração estrutural vascular (diminuição na deposição de colágeno e elastina), redução na expressão da enzima conversora de angiotensina (ECA) e dos níveis da matriz metaloproteinase-2 e 9 (MMPs 2 e 9), além da redução de biomarcadores de estresse oxidativo (MDA e proteínas carboniladas).

O tecido cerebral também apresentou alterações no seu perfil redox, como pode ser visto na Figura 33. Segundo esses achados, a suplementação com extrato farmacêutico de curcuma apresentou efeito protetor sobre a peroxidação lipídica, avaliada neste estudo através nos níveis de MDA (Figura 33D). No entanto, por não alterar atividade das enzimas CAT e SOD, ou os níveis de H_2O_2 , infere-se que o efeito antioxidante desse tratamento pode ter ocorrido através do aumento da atividade da GPx ou dos níveis de GSH, ou ainda por sequestro de ERONS, uma vez que todas essas ações podem resultar no efeito protetor às macromoléculas (KADRI et al., 2018; YULIANI; MUSTOFA; PARTADIREDDA, 2018).

Figura 31 – Marcadores redox cerebral, segundo o grupo de tratamento: controle (C); extrato farmacêutico de curcuma (Ext); e pó de curcuma (Pó), fase G1, (n= 5).



Legenda: SOD (A): superóxido dismutase; H₂O₂ (B): peróxido de hidrogênio; CAT (C): catalase e MDA (D): malondialdeído; fase G1.

** p<0,01 segundo o teste de tukey

Fonte: De Araujo, O. R. P.

6 CONCLUSÃO DA FASE G1

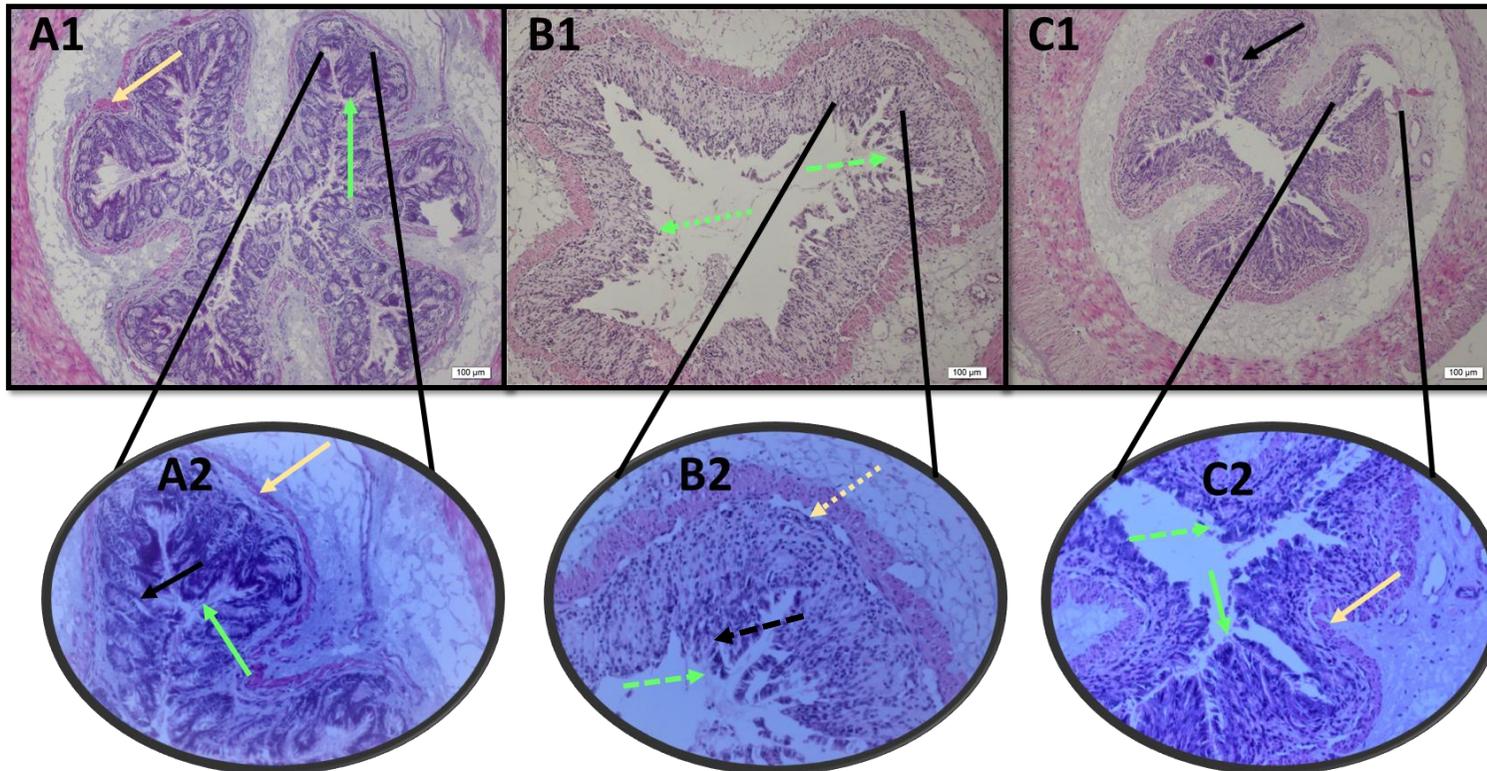
- A formulação rica em curcuminóides que apresentou melhor ação sobre o equilíbrio redox sistêmico em animais saudáveis foi a forma de Extrato farmacêutico de curcuma (ExtFarC), uma vez que reduziu a formação de MDA cerebral e da espécie H_2O_2 cardíaco, enquanto a formulação pó apresentou uma elevação no estado glicêmico destes animais.
- Não foram observados efeitos adversos redox em nenhuma das preparações estudadas.
- A partir desses resultados, a forma (ExtFarC) foi escolhida para dar continuidade ao trabalho (fase G2 – animais com colite ulcerativa moderada, induzida por sulfato de sódio dextrana – DSS).

7 RESULTADOS FASE G2

7.1 Análise histológica colônica.

Compreende-se, através da análise da Figura 34, que o SSD a 3% (p/v) conseguiu induzir a colite moderada uma vez que promoveu mudanças histológicas características da CUI, tais como: destruição das criptas de Lieberkühn (setas verdes pontilhadas) e das células de Paneth (setas pretas pontilhadas), bem como estreitamento e separação da lâmina própria (setas amarelas pontilhadas). Apesar do tratamento com o extrato farmacêutico de curcuma não ter evitado essas alterações (Figura 34C), percebe-se que nos grupos tratados as lesões/alterações estão presentes juntamente com áreas inalteradas, indicando a proteção parcial do tratamento. Esses achados corroboram com os encontrados no trabalho de Ung et al. (2015), que identificaram uma melhora histológica na arquitetura do colón de animais tratados com *Curcuma longa* emulsificada em carboximetil-celulose. Do mesmo modo, Beloqui et al. (2016), utilizando nano emulsão de Curcuma longa, encontraram uma redução do edema submucoso, alteração das estruturas da mucosa e infiltração leucocitária, levando a uma melhora significativa ao dano histológico do cólon.

Figura 32 – Avaliação histológica colônica através da coloração com hematoxilina e eosina dos grupos: controle (C) (A), colite moderada (CM) (B) (colite moderada induzida por sulfato de sódio dextrana – SSD 3%), e colite moderada tratado com extrato de Curcuma longa (Ext_M) (C): aumento de 50x – A1, B1 e C1; e aumento de 100x – A2, B2, C2).



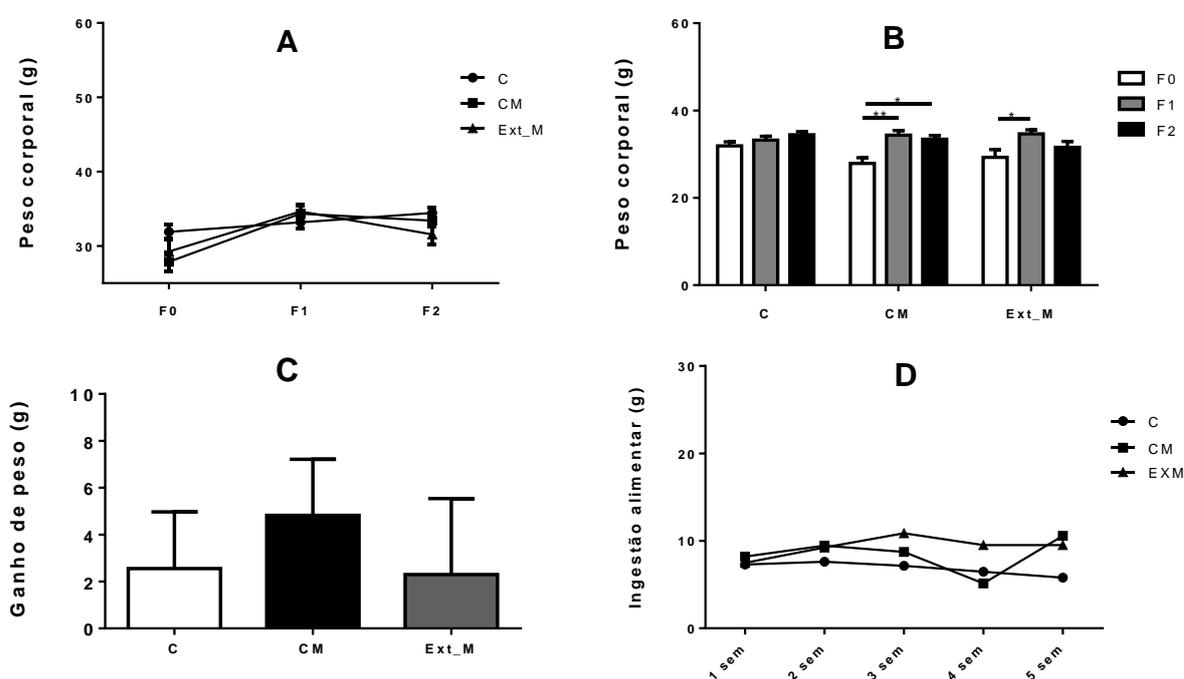
Legenda: Setas pretas contínuas – células de Paneth íntegras; setas pretas pontilhadas – destruição das células de Paneth; setas verdes contínuas – criptas de Lieberkühn íntegras; setas verdes pontilhadas – destruição das criptas de Lieberkühn; setas amarelas contínuas – lâmina própria íntegra; setas amarelas pontilhadas – lâmina própria separadas;

Fonte: De Araujo, O. R. P.

7.2 Avaliação da do peso corporal, ganho de peso, ingestão semanal da dieta e dosagem glicêmica

De acordo com a avaliação de ganho de peso corporal realizado na fase, G2 (Figura 35) percebe-se que não houve diferenças nos pesos intergrupos (Figura 35A), entretanto o CM no 1º dia de indução e no 38º dia da eutanásia apresentou um ganho de peso em comparação ao pré-tratamento, intragrupos (Figura 35B), e o Ext_M no 1º dia apresentou ganho de peso em comparação ao pré-tratamento. Com relação ao ganho de peso (Figura 35C) ou ingestão alimentar (Figura 35D) não houve diferença entre os grupos (comparativamente ao início e ao final do tratamento, indicando que não houve influência da curcuma (Ext_M) sobre a evolução ponderal dos animais, mas a colite induzida no grupo CM elevou a um aumento no peso dos animais no 1º e 30º dia e o Ext_M um aumento no 1º um possível indicativo de dano colônico.

Figura 33 – Peso corporal (A e B), ganho de peso (C) e ingestão semanal (D) dos animais de acordo com grupo e o período de tratamento, fase G2.



Legenda: C: grupo controle; CM: grupo controle moderado; Ext_M: grupo tratado com extrato farmacêutico de curcuma moderado; F0: fase pré-tratamento; F1: fase de tratamento e F2: fase de indução da doença; fase G2.

** $p < 0,05$ segundo teste t

Fonte: De Araujo, O. R. P.

Na F0, fase está de pré-tratamento onde os animais ainda não receberam as dietas da fase de tratamento, não houve diferença entre os grupos; contudo, na F1, fase de tratamento animais receberam as dietas comerciais e modificada, o grupo CM apresentou elevação significativa do peso corporal em comparação com o grupo C ($p < 0,0001$) (Figura 36B). Como ambos os grupos receberam a mesma ração, não há, a princípio, explicação fisiológica para essa alteração. Por outro lado, após a indução da colite, a glicemia desse grupo se normalizou, F2, fase essa onde ocorreu a indução da colite ulcerativa pelo sulfato de sódio dextrana, ficando semelhante estatisticamente ao grupo C (Figura 36B). Ainda nessa fase, o que chama a atenção é o aumento nos níveis glicêmicos dos animais do grupo Ext_M, comparativamente ao grupo C ($p < 0,0001$) e ao grupo C_M ($p < 0,01$) (Figura 36B).

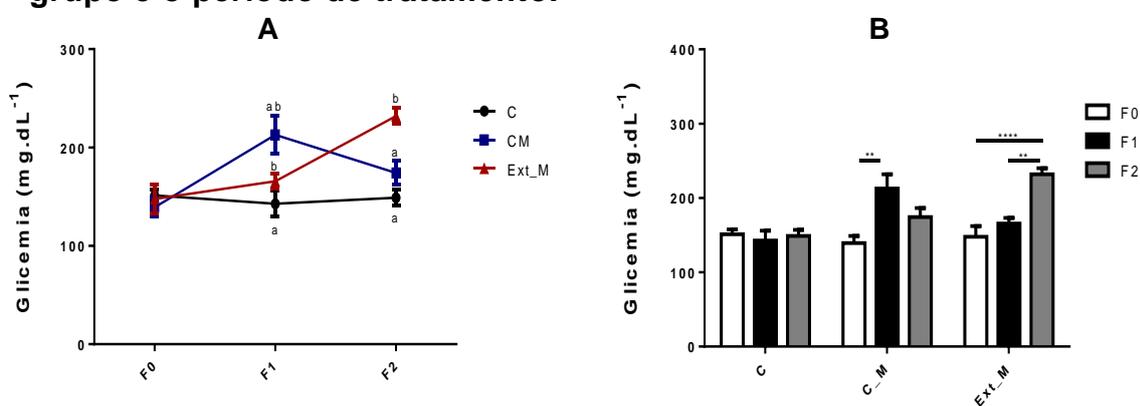
Analisando a Figura 36B, é possível identificar que o grupo C permaneceu sem alterações na glicemia durante todo o período experimental. Já o grupo CM apresentou uma elevação nos seus níveis glicêmicos na F1 em relação ao início do experimento, mas que voltou aos níveis basais na F2, após a indução da colite. Por outro lado, o grupo Ext_M demonstrou uma elevação glicemia ao fim do período experimental F2, indicando que a indução à colite associada ao consumo do extrato farmacêutico induziu efeitos hiperglicêmicos importantes, diferente do encontrado na literatura, onde a curcumina apresenta efeito hipoglicemiante, quando administrada em extrato etanólico, incorporada à carboximetilisina, em suspensão aquosa, ou até mesmo administrada na ração (SHARMA, et al., 2006; HUSSEIN; ABU-ZINADAH, 2010).

Esses dados em conjunto mostram que na presença da colite ulcerativa o extrato farmacêutico apresentou uma ação hiperglicêmica, diferente do que aconteceu com os animais saudáveis (fase G1), quando a suplementação não alterou a glicemia dos animais. Esses achados chamam a atenção, uma vez que a *Curcuma longa* é conhecida por seu poder hipoglicêmico quando utilizado em modelos animais diabéticos.

De acordo com a revisão sistemática conduzida por Zhang et al. (2013), a curcuma teria poder hipoglicemiante devido aos seus efeitos sobre a redução nos níveis de TNF- α e AGL além de inibir o NF-kB, peroxidação lipídica e atividades de

enzimas lisossômicas (N-acetil-d-glicosaminidase, -d-glucuronidase, -d-galactosidase). Adicionalmente, a curcumina tem a capacidade de indução da ativação do receptor ativado por proliferadores de peroxissoma gama (PPAR- γ), elevação dos níveis plasmáticos de insulina e da atividade da lipoproteína lipase (LPL). A curcumina também está envolvida na ativação de enzimas no fígado como a glicogênio sintetase, que estão associadas à glicólise, ao processo metabólico glicogênico e lipídico e à ativação do fator nuclear fator 2 relacionado ao eritróide-2 (Nrf2) (ZHANG et al., 2013).

Figura 34 – Glicemia de jejum dos animais da fase G2 de acordo com grupo e o período de tratamento.



Legenda: C: grupo controle; CM: grupo controle moderado e Ext_M: grupo tratado com extrato farmacêutico de curcuma moderado; F0: fase pré-tratamento; F1: fase de tratamento e F2: fase de indução da doença; fase G2, (n= 6).

** p<0,05; *** p<0,01 segundo teste t

Fonte: De Araujo, O. R. P.

A Tabela 2 traz a avaliação dos pesos absolutos e relativos dos órgãos, segundo o grupo de tratamento. Percebe-se que não houve alterações nesses parâmetros, semelhantemente aos achados nos animais saudáveis.

Tabela 2 – Pesos absoluto e relativo do cólon, fígado, coração, cérebro e baço, segundo o grupo estudado (média ± EP); fase G2.

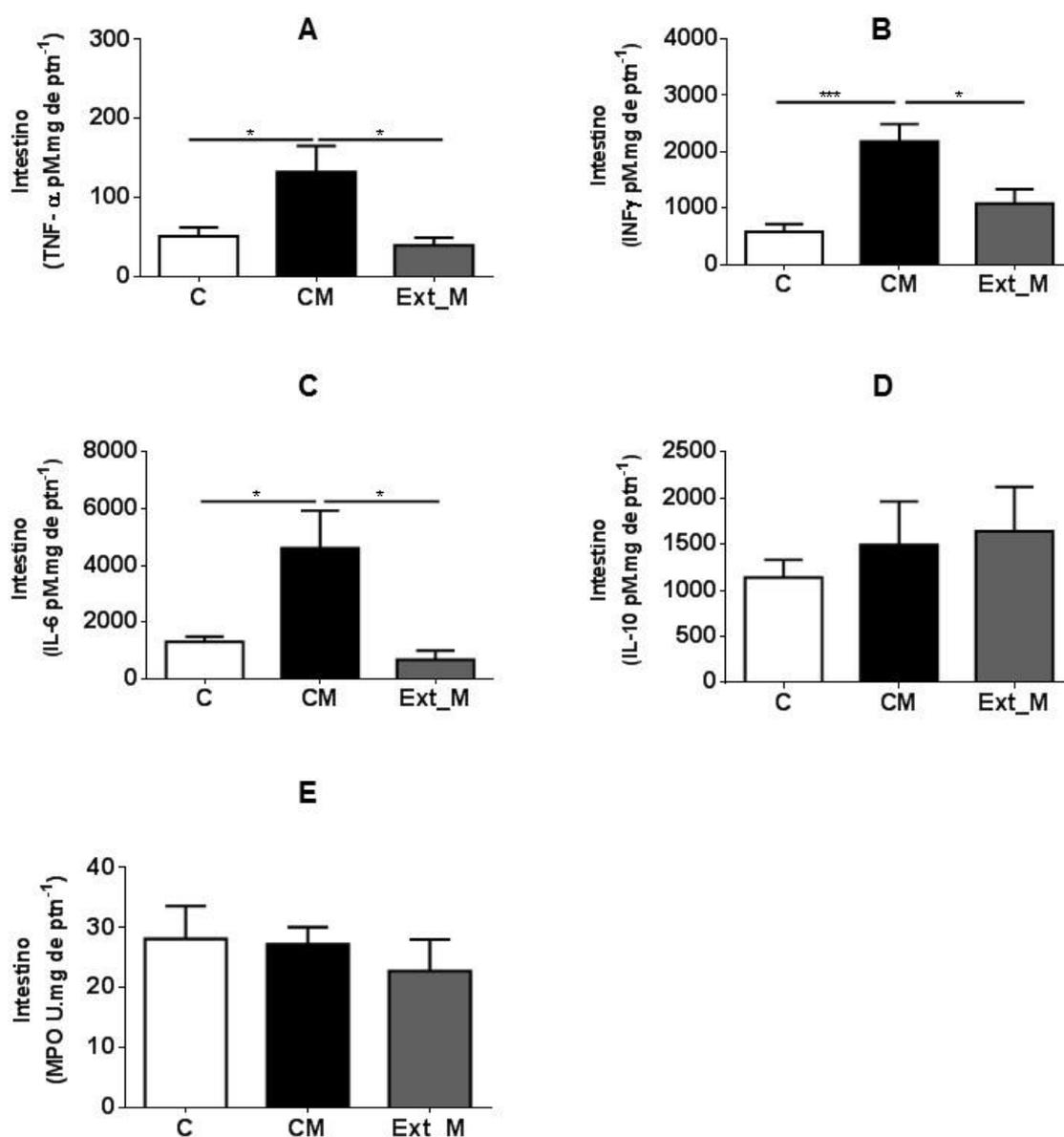
	GRUPO CONTROLE (N=6)	GRUPO COLITE MODERADA (N=6)	GRUPO EXTRATO MODERADO (N=6)
CÓLON (G)	0,283 ± 0,020	0,308 ± 0,015	0,426 ± 0,100
RAZÃO CÓLON/PESO CORPORAL	0,008 ± 0,0005	0,009 ± 0,0002	0,013 ± 0,002
FÍGADO (G)	1,538 ± 0,056	1,569 ± 0,038	1,537 ± 0,082
RAZÃO FÍGADO/PESO CORPORAL	0,048 ± 0,003	0,046 ± 0,0005	0,048 ± 0,001
CORAÇÃO (G)	0,178 ± 0,007	0,162 ± 0,006	0,1802 ± 0,005
RAZÃO CORAÇÃO/PES O CORPORAL	0,005 ± 0,0002	0,004 ± 0,0001	0,005 ± 0,0001
CÉREBRO (G)	0,2717 ± 0,009	0,295 ± 0,002	0,284 ± 0,005
RAZÃO CÉREBRO/PES O CORPORAL	0,007 ± 0,0003	0,008 ± 0,0001	0,009 ± 0,0003
BAÇO	0,194 ± 0,026	0,295 ± 0,066	0,295 ± 0,066
RAZÃO BAÇO/PESO CORPORAL	0,005 ± 0,0007	0,008 ± 0,001	0,009 ± 0,001

Fonte: De Araujo, O. R. P.

7.3 Perfil inflamatório tecidual dos animais segundo as citocinas: TNF- α , INF- γ , IL-6, e IL-10 e a enzima MPO

O perfil inflamatório no cólon dos animais da fase G2 pode ser visto na Figura 35.

Figura 35 – Perfil inflamatório colônico, segundo os grupos de tratamento: controle (C), colite moderada (CM) (colite moderada induzida por sulfato de sódio dextrana – SSD 3%), e colite moderada tratado com extrato de *Curcuma longa* (Ext_M).



Legenda: INF- γ : interferon gama; IL: interleucina; MPO: mieloperoxidase; TNF- α : fator de necrose tumoral alfa. * p < 0,05; *** p < 0,001 - segundo teste de tukey.

Fonte: De Araujo, O. R. P.

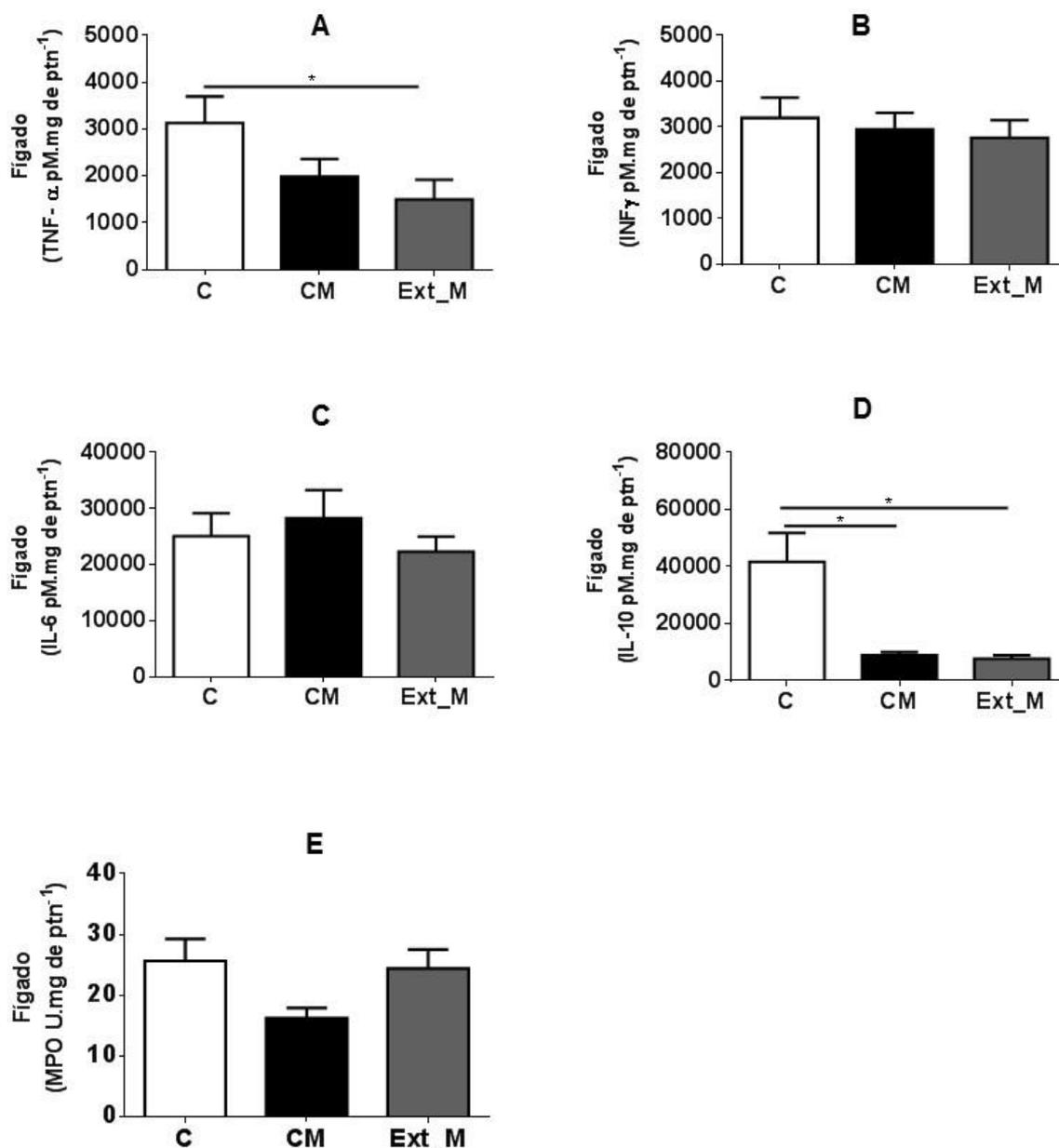
Analisando a Figura 35, percebe-se que a colite moderada induziu ao processo pró-inflamatório (Figura 35A, B e C) e o tratamento restaurou os níveis das 3 citocinas analisadas ao padrão normal. Esses achados diferem do encontrado por outro estudo do presente grupo. Moura et al. (2016) não conseguiram encontrar alterações nos níveis de TNF- α e INF- γ nos animais com colite. Contudo, é importante salientar que no referido trabalho, a colite induzida foi leve, diferentemente deste trabalho, em que a colite induzida foi na sua forma moderada. Por outro lado, esses resultados foram semelhantes aos de Governata et al. (2018), em um estudo *in vitro*, que observou que a *Curcuma longa* foi capaz de reduzir diversas citocinas, como TNF- α , IL-8 e IL-6. Resultados semelhantes em relação IL-6 e TNF- α foi encontrado por Kondamudi et al. (2015), em um modelo experimental de colite induzida por dinitroclorobenzeno (DNCB) tratada com deidrozingerona (DHZ) via oral (100 mg/kg por 8 dias), um meio-análogo sintético da curcumina.

Por outro lado, não houve influência da colite nem do tratamento com extrato farmacêutico de curcuma nos níveis de IL-10 (Figura 35D) – citocina anti-inflamatória – e de MPO (Figura 35E). A não influência da curcuma sobre os níveis da IL-10 diferem dos achados por McCann et al. (2014), em seu trabalho *in vitro*, que observou que quanto maior o conteúdo de curcumina nos extratos em que as linhagens celulares eram incubadas, maiores os níveis dessa citocina. A dieta contendo 2% de curcumina também foi capaz de melhorar a expressão de mRNA e IL-10, em ratos com colite induzida por ácido trinitrobenzeno sulfônico (JIAN et al., 2004). Do mesmo modo, Gopu et al., (2015) que trabalharam com ratos induzidos à colite por ácido acético, com uma dosagem de 50 mg/kg por dia de curcuma, durante um período de 2 semanas, verificaram um aumento nos níveis de IL-10 colônico.

Os resultados de MPO deste trabalho também diferem do encontrado pelo estudo por Gopu et al., (2015). Como principais achados, eles observaram que a *Curcuma longa* reduziu os níveis colônicos de MPO. Uma redução na MPO também foi confirmada por Kondamudi et al. (2015).

O perfil inflamatório no fígado dos animais da fase G2 pode ser visto na Figura 36.

Figura 36 – Perfil inflamatório hepático, segundo o grupo de tratamento: controle (C), colite moderada (CM) (colite moderada induzida por sulfato de sódio dextrana – SSD 3%), e colite moderada tratado com extrato de *Curcuma longa* (Ext_M), fase G2, (n= 6).



Legenda: INF- γ : interferon gama; IL: interleucina; MPO: mieloperoxidase; TNF- α : fator de necrose tumoral alfa. * A p<0,05 segundo teste de Dunn's; * D p<0,05 segundo teste de tukey.

Fonte: De Araujo, O. R. P.

Percebe-se que a colite moderada, independente do tratamento ou não com curcuma, reduziu significativamente a proteção contra a inflamação do fígado, uma

vez que os níveis de IL-10 (Figura 36D) estão mais baixos nos grupos CM e Ext_M vs grupo C ($p < 0,05$), indicando uma maior propensão desses animais à injúria hepática, muito provavelmente pela conexão existente entre fígado e intestino, que ao ser rompida (vide alterações histológicas observadas no grupo doente - Figura 34) permitiu a ativação de mediadores inflamatórios e oxidantes no tecido hepático. Por sua vez, o tratamento com curcuma, conseguiu melhorar os níveis de TNF- α , (Figura 38A) provavelmente para compensar a diminuição do IL-10. Assim como neste trabalho, Anji et al. (1999) também observaram baixos níveis de IL-10 em ratos com doença do fígado gorduroso não alcoólico (DFGNA), comparativamente aos animais sem essa desordem hepática, assim como também Baixos níveis hepáticos de IL-10 foram observados em coelhos com DFGNA (FOUSEKIS; THEOPISTOS; KATSANOS, 2018).

A associação de distúrbios hepáticos à DII não está clara. A atribuição de fatores imunológicos, genéticos e ambientais pode contribuir para a patogenia e correlação entre DII e manifestações hepatobiliares (ROJAS-FERIA et al., 2013). A associação mais comum das doenças no eixo intestino-fígado é a colangite esclerosante primária (CEP), particularmente na CUI.

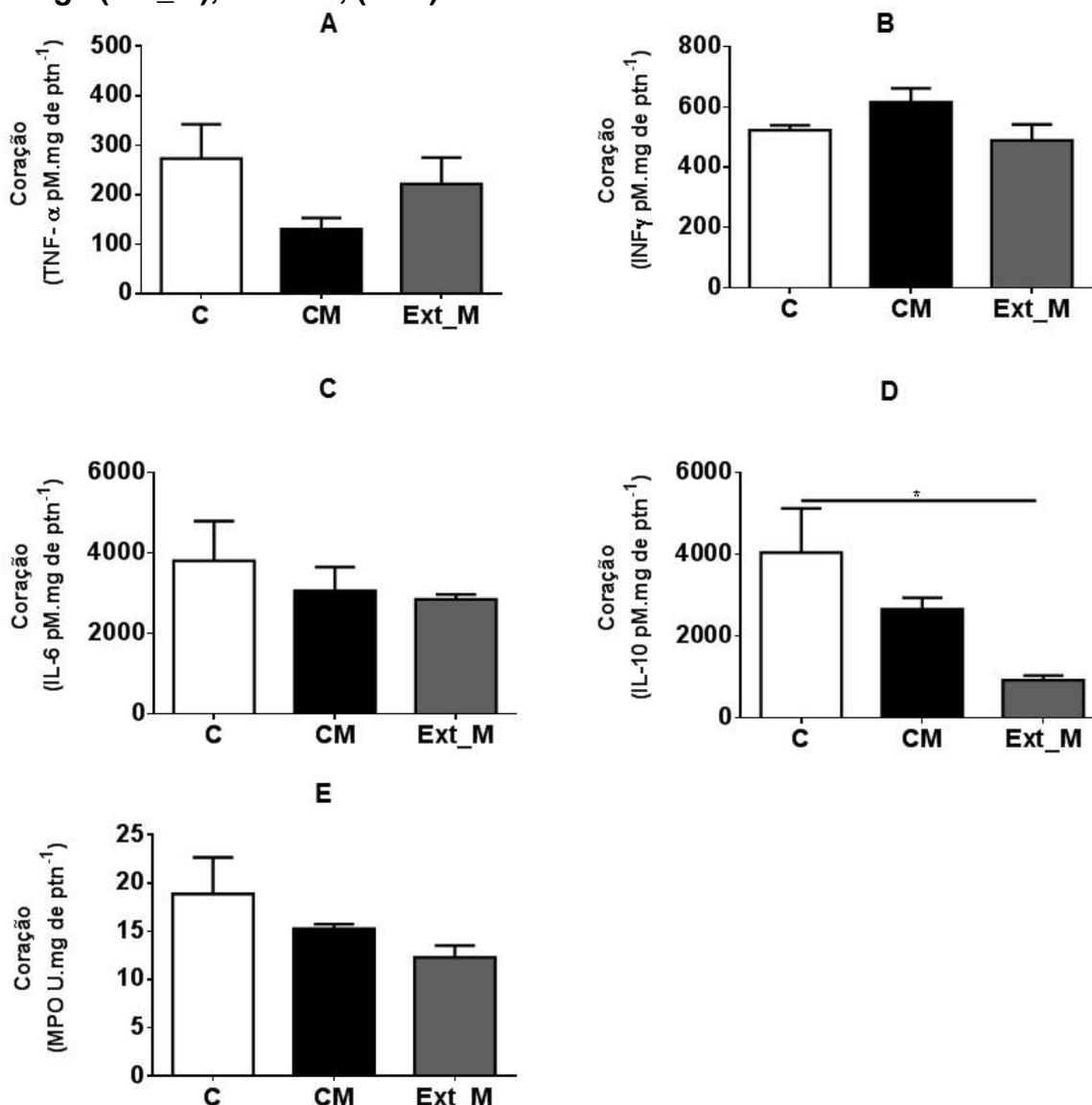
Em outra pesquisa realizada pelo presente grupo de trabalho, foram investigadas alterações hepáticas induzidas pela colite. Os autores não encontraram relação entre a colite leve induzida por SSD (2% p/v) e aumento da atividade inflamatória hepática (investigada através dos níveis de TNF- α , INF- γ e IL-10) (MOURA et al. 2016).

Nenhuma alteração nos níveis de MPO hepático foi identificada (Figura 36E).

Diversas hipóteses foram propostas para a elucidação da associação entre distúrbios hepáticos e DII, como bacteremia portal crônica, alterações na microbiota intestinal, infecções virais crônicas não reconhecidas e anormalidades genéticas (laços de imunorregulação ou transporte de bile).

O perfil inflamatório no cérebro dos animais da fase G2, pode ser visto na Figura 39.

Figura 37 – Perfil inflamatório cardíaco, segundo o grupo de tratamento: controle (C), colite moderada (CM) (colite moderada induzida por sulfato de sódio dextrana – SSD 3%), e colite moderada tratado com extrato de *Curcuma longa* (Ext_M), fase G2, (n= 6).



Legenda: INF- γ : interferon gama; IL: interleucina; MPO: mieloperoxidase; TNF- α : fator de necrose tumoral alfa. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ - segundo teste de Tukey.

Fonte: De Araujo, O. R. P.

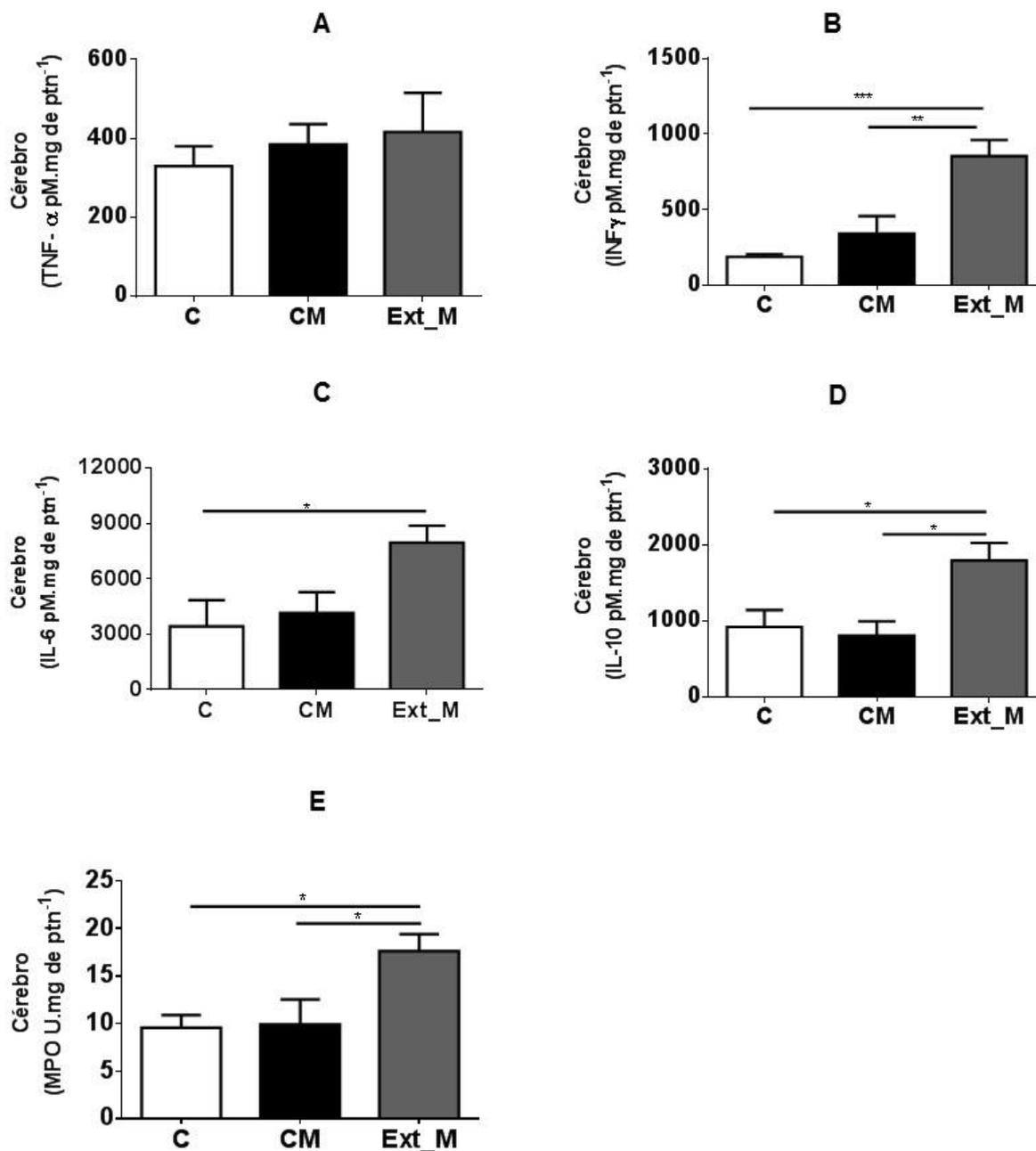
O grupo tratado com extrato de *Curcuma*, no coração, apresentou menores níveis de IL-10, Figura 39D, indicando um maior risco inflamatório nesses animais; entretanto não houve mudanças em nenhuma das citocinas pro-inflamatórias, nem aumento da MPO.

A IL-10, uma citocina anti-inflamatória, secretada por células T reguladoras e macrófagos, tem como uma de suas funções limitar a resposta imune. Defeitos como perda de função da IL-10 ou do seu receptor, ou até mesmo baixa secreção desta citocina, levam a uma resposta inflamatória aumentada por ausência da regulação (GONZÁLEZ-LAMA et al., 2015). No tecido cardíaco, sua avaliação é considerada limitada, porém já está comprovada a ação do hormônio de crescimento e do tratamento com esteroides em relação ao incremento de IL-10 no coração. Interessantemente, em um modelo murino de falência cardíaca, o tratamento com IL-10 humano recombinante aumentou significativamente a sobrevivência desse grupo, em comparação com aquele que não recebeu essa citocina. Essa maior sobrevivência deveu-se a atenuação das lesões cardíacas e supressão das citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL-2 (LACRAZ et al., 1995).

Mais recentemente, Kaur, Sharma e Singal (2019) avaliaram a função cardíaca em ratos após indução de infarto no miocárdio. Esses autores concluíram que menores níveis de IL-10 se correlacionaram com diminuição na função cardíaca.

Diante disso, percebe-se que nos animais com colite a suplementação com extrato farmacêutico não apresentou resultados favoráveis, devendo ser melhor avaliado em estudos futuros.

Figura 38 – Perfil inflamatório cerebral, segundo o grupo de tratamento: controle (C), colite moderada (CM) (colite moderada induzida por sulfato de sódio dextrana – SSD 3%), e colite moderada tratado com extrato de Curcuma longa (Ext_M), fase G2, (n= 6).



Legenda: INF- γ = interferon gama; IL = interleucina; MPO = mieloperoxidase; TNF- α = fator de necrose tumoral alfa.* $p < 0,05$ segundo teste de Tukey.

Fonte: DE ARAUJO, O. R.

A Figura 40 indica que a colite moderada não exerceu qualquer ação inflamatória no tecido cerebral. Por sua vez, o grupo tratado com extrato de curcuma apresentou tanto ação pró-inflamatória, aumentando os níveis de INF- γ (Figura 40B), vs grupos C e CM, e IL-6 (Figura 40C), vs grupo C como anti-inflamatória, elevando os níveis de IL-10 (Figura 40D), vs grupos C e CM.

As interações entre o cérebro e o sistema imunológico revelaram conexões bidirecionais entre os sistemas neural e neuroendócrino e o sistema imunológico. O sistema nervoso central (SNC) regula o sistema imunológico por meio das vias neuronais e neuroendócrinas e, desta forma, o sistema imunológico sinaliza o cérebro por meio das rotas neurais e humorais (MARQUES; CIZZA; STERNBERG, 2007).

As citocinas são produzidas na periferia por uma variedade de células do sistema imunológico, como os monócitos, macrófagos, células T ativadas, células B, célula natural *killer* (NK) e fibroblastos; são também produzidas por outros tipos celulares, como células musculares lisas, células endoteliais, fibroblastos, queratinócitos, células musculares cardíacas e glândulas sudoríparas écrinas. Além do mais, as citocinas são também produzidas no SNC por micróglia, astrócitos, células endoteliais vasculares e fibroblastos. No sistema nervoso periférico, as citocinas coordenam componentes complexos da resposta imunológica, incluindo as respostas inatas e adaptativas. As citocinas da resposta inata (defesas celulares imediatas não-específicas) (TNF, IL-12, INF e IL-1) são produzidas por macrófagos e células NK; estas auxiliam na ativação de neutrófilos, células NK e macrófagos. Posteriormente, na resposta adaptativa, a produção de IL-1, IL-2, IL-6, principalmente por linfócitos T, auxilia na ativação de células T, células B, macrófagos, neutrófilos e eosinófilos. Esses aspectos da resposta inflamatória fornecem anticorpos e defesas celulares imediatas não-específicas (inatas) e, posteriormente, específicas (adaptativas) contra infecções e outros ataques. No cérebro, as citocinas são responsáveis pela ativação neuroendócrina e neuronal (GALIC; RIAZI; PITTMAN, 2013).

As citocinas regulam o crescimento e a proliferação das células gliais, modulam a atividade dos peptídeos opióides endógenos e ativam o eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA). A produção central de citocinas pode ser desencadeada

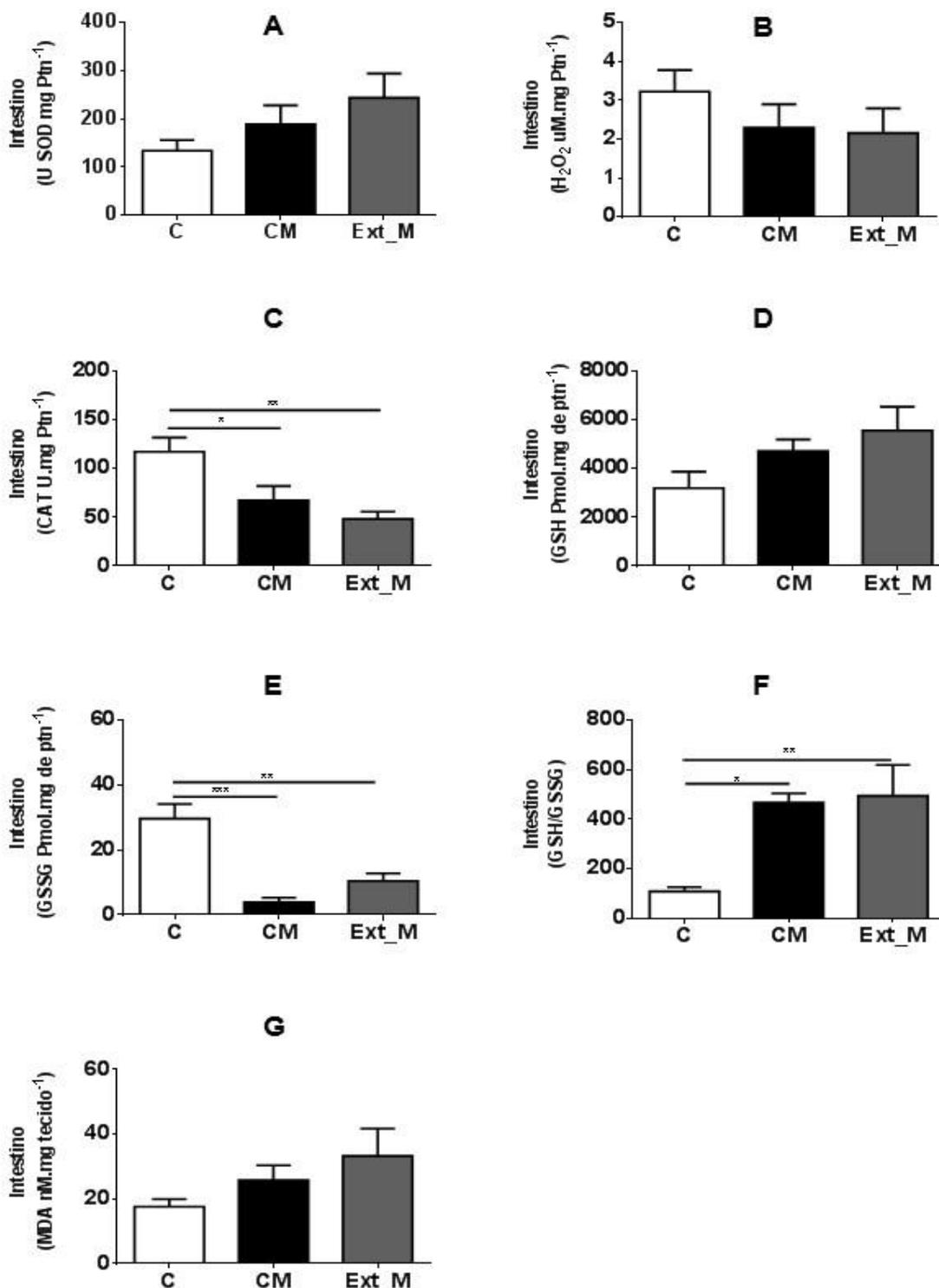
pelo estresse, exercício físico, isquemia, processos neurovegetativos, autoimunidade e infecção. É interessante que, enquanto as citocinas periféricas medeiam a resposta inflamatória, as citocinas cerebrais podem ser ativadas na ausência de inflamação local. Portanto, a expressão de citocinas no cérebro não é necessariamente uma indicação de inflamação. As citocinas anti-inflamatórias (IL-4, IL-10, IL-13, TGF- β) reduzem a resposta inflamatória por meio da diminuição das citocinas pró-inflamatórias e da supressão da ativação de monócitos (GALIC; RIAZI; PITTMAN, 2013; MARQUES; CIZZA; STERNBERG, 2007).

A IL-10, citocina antiinflamatória, protege o cérebro contra doenças degenerativas, como o Alzheimer, o que seria um fator interessante na administração de curcuma, haja vista o aumento dessa citocinas nos animais tratados com Ext_M.

Por outro lado, o tecido cerebral (Figura 40E) apresentou um aumento significativo na atividade da MPO no grupo Ext_M comparativamente ao grupo C e ao grupo CM ($P < 0,05$). Cabe ressaltar que a MPO possui papel fundamental na produção de EROS e pode ter participação na imunomodulação, pois seu principal produto, o ácido hipocloroso (HOCl), está envolvido na sinalização da apoptose em vários tipos de células, inclusive nas células do sistema imune, como nos neutrófilos.

7.5 Perfil oxidativo obtido a partir da análise de dano oxidativo (MDA), produção de espécie pró-oxidante (H_2O_2) e de defesa antioxidante enzimática (SOD e CAT), e não enzimática (GSH, GSSG e Razão GSH/GSSG).

Figura 39 – Marcadores redox no colón, segundo o grupo de tratamento: controle (C), colite moderada (CM) (colite moderada induzida por sulfato de sódio dextrana – SSD 3%), e colite moderada tratado com extrato de Curcuma longa (Ext_M), fase G2, (n= 6).



Legenda: * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p > 0,001, segundo os testes de Kolmogorov-Smirnov e de Tukey/teste.

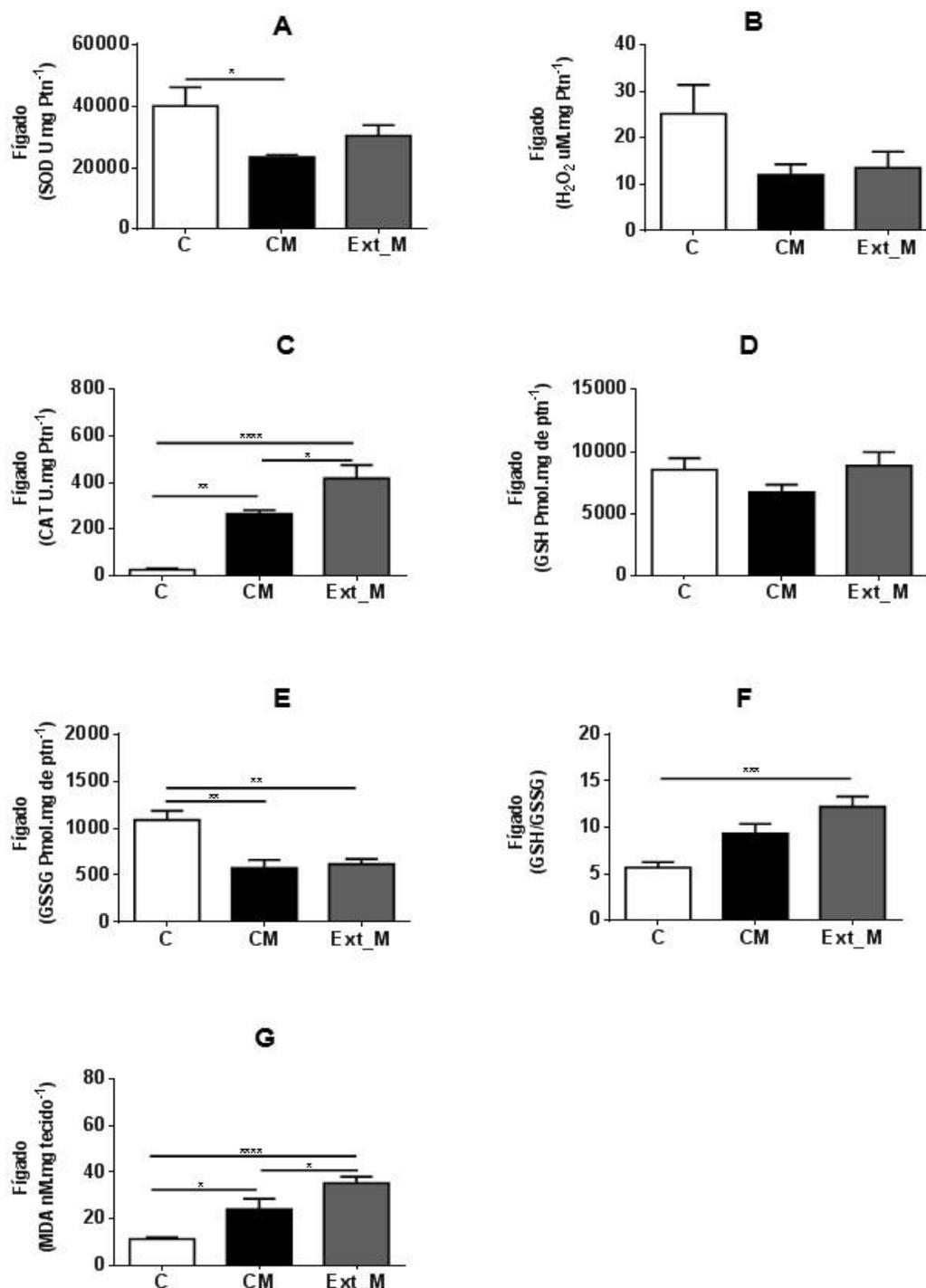
Fonte: De Araujo, O. R. P.

Sobre o desequilíbrio redox, observa-se no intestino dos grupos com colite moderada, tratado ou não com *Curcuma*, menores níveis de GSSG (Figura 41E) e, conseqüentemente, uma maior razão GSH/GSSH (Figura 41F). Esses resultados, em conjunto com a não modificação nos níveis de MDA (Figura 41G), que revela que não houve danos às membranas lipídicas (salvaguardando as limitações do método), indicam que a redução da glutathiona oxidada, com melhora significativa na razão GSH/GSSG, pode ter sido um mecanismo compensatório encontrado pelo intestino, de otimização desse sistema antioxidante, afim de manter os níveis de peróxido normais e, conseqüentemente, de radicais hidroxila, visto que a doença causou redução na catalase.

Em modelos animais de colite, os níveis de GSH estão normalmente reduzidos (RISE; PRABHU; GURUVAYOORAPPAN, 2012; PRABHU; GURUVAYOOR APPAN, 2014; RABELO SOCCA et al., 2014), diferentemente dos achados deste trabalho. Contudo, vale salientar que em biópsias colônicas já foram observados desde redução (TSUNADA et al., 2003), até ausência de alterações nos níveis de GSH (KRUIDENIER et al., 2003), assim como aumento nos níveis de GSSG (TSUNADA et al., 2003).

Adicionalmente, não se observam mudanças nos níveis de SOD e da MPO em nenhum dos grupos. Diferentemente dos achados de Arafa et al., (2009) – que induziram a colite com SSD a 3% em ratos e usaram 100 mg/kg de curcumina por 7 dias – e Mouzaoui, Rahim e Djerdjouri (2012) – que induziram a colite através de TNF- α e trataram os animais com *Curcuma* e aminoguanidina por 30 min, este trabalho não identificou alteração na peroxidação causada pela colite, tampouco melhoras nos níveis MDA nos animais tratados com *Curcuma longa*.

Figura 40 – Marcadores redox no tecido hepático, segundo o grupo de tratamento: controle (C), colite moderada (CM) (colite moderada induzida por sulfato de sódio dextrana – SSD 3%), e colite moderada tratado com extrato de Curcuma longa (Ext_M), fase G2, (n= 6).



Legenda: * p > 0,05, ** p > 0.01, *** p > 0.001 e **** p > 0,0001 segundo os testes de Kolmogorov-Smirnov e de Tukey/teste, fase G2.

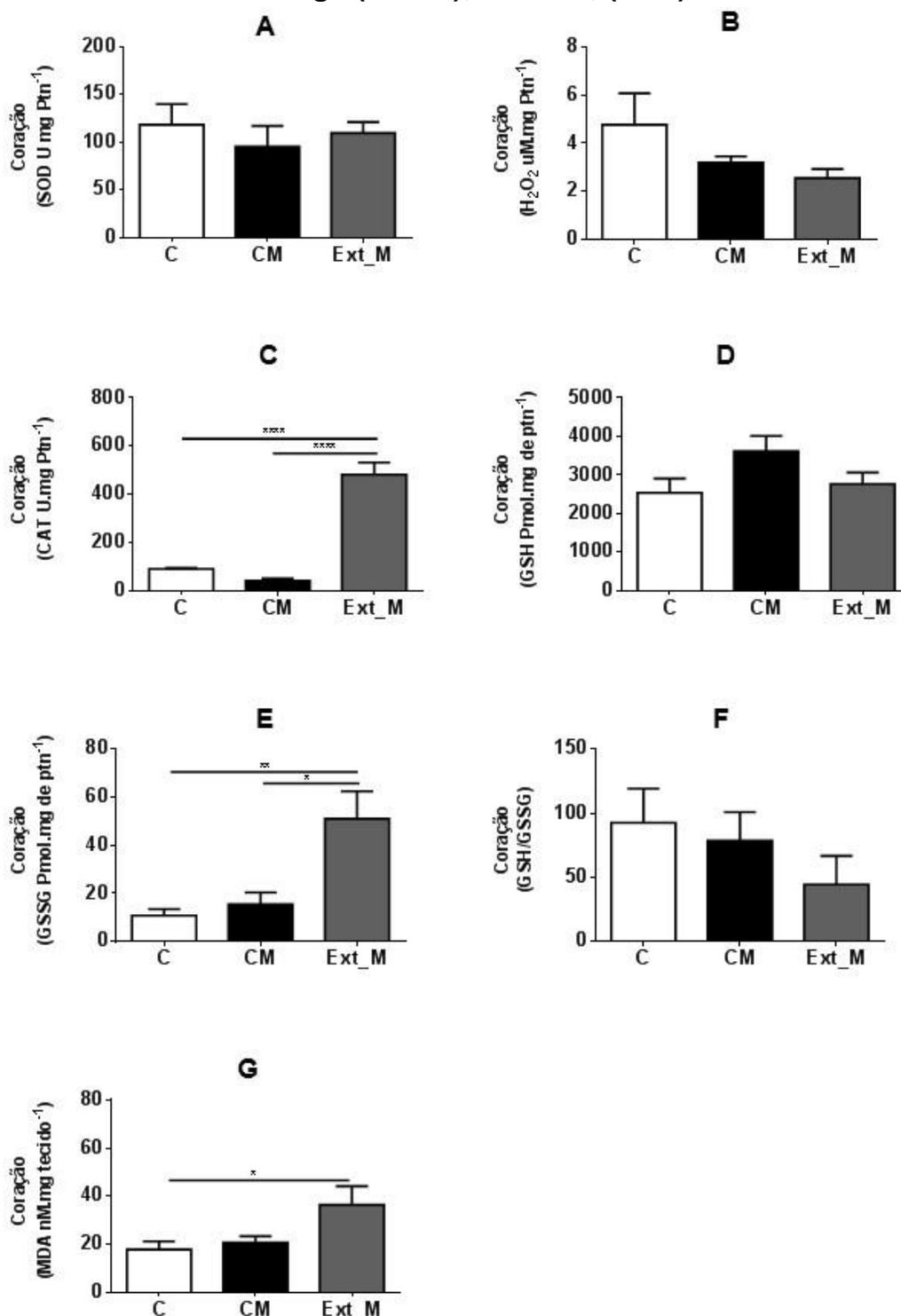
Fonte: De Araujo, O. R. P.

Os animais do grupo CM apresentaram no tecido hepático uma menor atividade da SOD (Figura 42A) vs grupo C que não refletiu em uma maior concentração de peróxido (Figura 42B), muito provavelmente porque nesses animais, assim como no intestino, também aconteceu uma elevação na enzima catalase (Figura 42C) e uma menor concentração de GSSG (Figura 42E), que, porém, não resultou em uma melhora na razão GSH/GSSG (Figura 42F).

Por conta dessas mudanças, esses animais apresentaram uma maior destruição de membranas lipídicas (maiores níveis de MDA) (Figura 42G), confirmando a alteração redox, diferente de Mouzaoui, Rahim e Djerdjouri (2012), que investigaram o tratamento à base de *Curcuma* e aminoguanidina, ofertado a ratos com colite imunomediada e obtiveram resultados diferentes do exposto, percebendo uma diminuição em marcadores de estresse oxidativo, como o MDA formado no tecido hepático. Por outro lado, os animais tratados com o extrato farmacêutica da curcuma apresentaram maiores níveis de catalase (vs grupos C e CM) (Figura 42C), também sem alteração na concentração de peróxido. Adicionalmente, diferentemente do grupo doente, a *Curcuma* conseguiu melhorar a razão GSH/GSSG (Figura 42F), porém essa melhora foi incapaz de proteger o fígado contra a peroxidação lipídica, estimados pelos níveis de MDA (Figura 42C) sendo inclusive mais intensa nesse grupo que no grupo doente sem tratamento (CM).

Não se observaram mudanças nos níveis de MPO hepáticas. O fígado está exposto a toxinas e produtos da microbiota autóctone através do eixo com o intestino estabelecido pela veia porta. Desta forma, auxilia na manutenção da homeostase desse eixo fígado-intestino. O fígado possui células do sistema imunológico como macrófagos, linfócitos e *Natural Killer*, células estas que têm papel fundamental na resposta inflamatória ou em lesões crônicas como EO (GARCOVICH et al., 2012).

Figura 41 – Marcadores redox no tecido cardíaco, segundo o grupo de tratamento: controle (C), colite moderada (CM) (colite moderada induzida por sulfato de sódio dextrana – SSD 3%), e colite moderada tratado com extrato de *Curcuma longa* (Ext_M), fase G2, (n= 6).



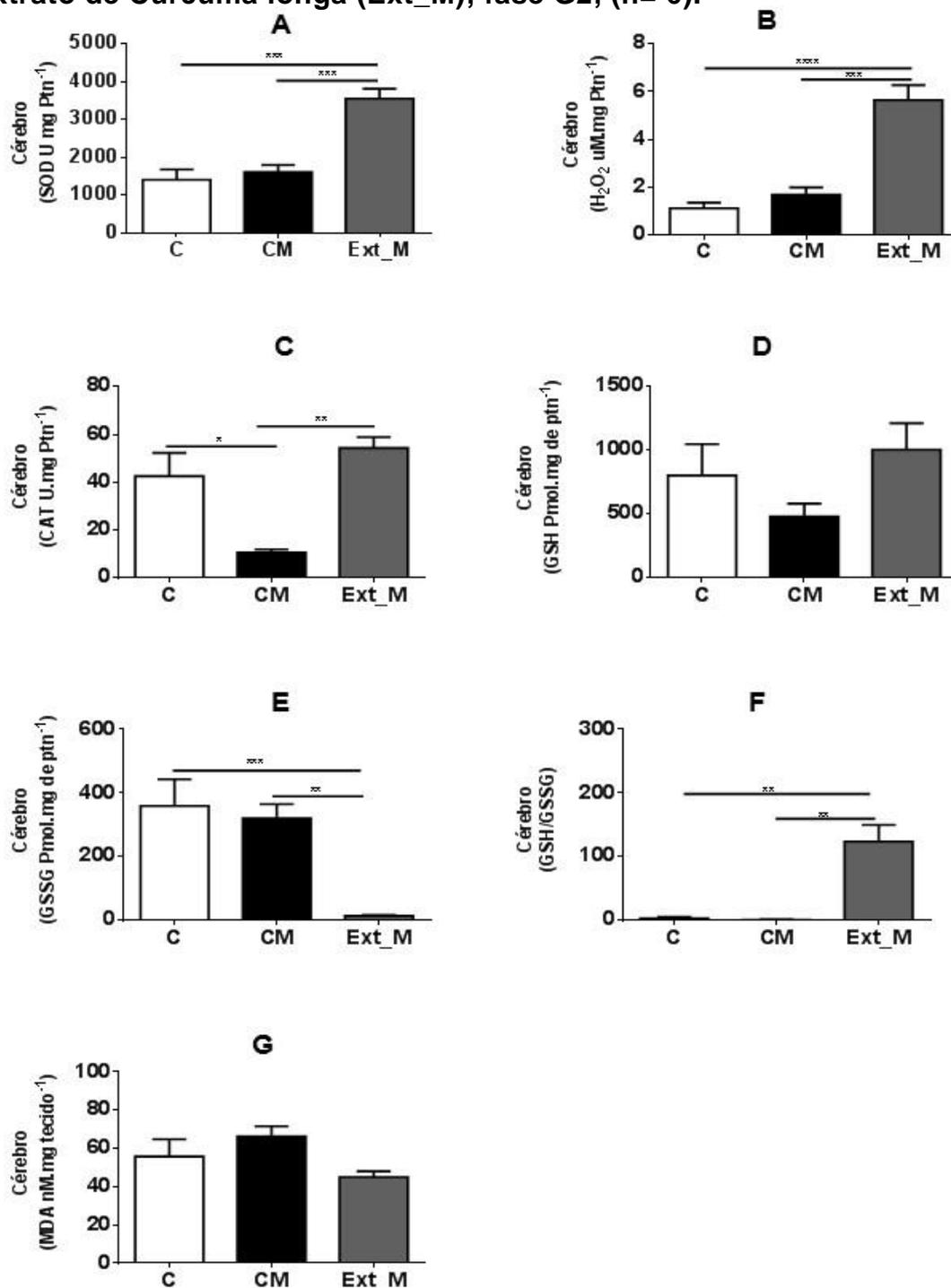
Legenda: * p>0,05, ** p>0.01 e **** p>0,0001, segundo os testes de Kolmogorov-Smirnov e de Tukey/teste.

Fonte: De Araujo, O. R. P.

Os animais do grupo CM não apresentaram qualquer alteração redox cardíaca (Figura 43). Por outro lado, o grupo tratado com *Curcuma* apresentou maiores níveis de catalase (vs grupos C e CM) (Figura 43C). Essa elevação foi capaz de manter os níveis de peróxido normais (Figura 43B). No entanto ao combinar essas mudanças com as elevações de GSSG (Figura 43E) e do MDA, (Figura 43G) concluímos que o extrato farmacêutico de curcuma não apresentou efeitos favoráveis ao coração, mesmo sem ter sido identificada mudança na razão GSH/GSSG. No estresse oxidativo intenso e continuado ocorre queda dos níveis de GSH, que é resultante do aumento da formação de seu estado oxidado GSSG após vários ciclos e subsequente degradação no meio extracelular, da S-glutathionilação proteica e da geração excessiva de adutos advindos da reação anterior com compostos com características eletrofílicas, que conjuntamente acarretam uma redução da razão GSH/GSSG (GIUSTARINI et al., 2015).

Não foram observadas mudanças para os demais marcadores redox. A ação do extrato da curcuma sobre o perfil redox cardíaco em animais com colite precisa ser melhor investigada.

Figura 42 – Marcadores redox no tecido cerebral, segundo o grupo de tratamento: controle (C), colite moderada (CM) (colite moderada induzida por sulfato de sódio dextrana – SSD 3%), e colite moderada tratado com extrato de Curcuma longa (Ext_M), fase G2, (n= 6).



Legenda: * $p > 0.05$, *** $p > 0.01$, **** $p > 0.001$, **** $p > 0.0001$, segundo os testes de Kolmogorov-Smirnov e de Tukey/teste.

*** **** A: $p > 0.01$ e $p > 0.0001$ Kolmogorov-Smirnov. **** B: $p > 0.0001$ Kolmogorov-Smirnov; * ** C: $p > 0.05$ e $p > 0.01$ Tukey/teste; ** **** E $p > 0.01$ e $p > 0.001$ Tukey/teste e ** *** F: $p > 0.01$ e $p > 0.001$ Tukey/teste, fase G2.

Fonte: De Araujo, O. R. P.

Os animais do grupo CM no tecido cerebral apresentaram uma redução na atividade da catalase (Figura 44C). Essa redução não refletiu em qualquer mudança nos níveis de peróxido (Figura 44B) ou de peroxidação lipídica (Figura 44G). Por outro lado, o grupo tratado com *Curcuma*, apresentou maiores níveis de SOD (Figura 44A) e, conseqüentemente, de peróxido de hidrogênio (vs grupos C e CM). Em contrapartida, a curcuma foi hábil em restaurar os níveis de catalase (Figura 44C), reduziu os níveis de GSSG (Figura 44E) e aumentar significativamente a razão GSH/GSSG (Figura 44F). Essas ações benéficas da *Curcuma* no cérebro, provavelmente foram as responsáveis pela manutenção dos níveis de MDA dentro da normalidade. Diferente do trabalho de Morrone et al. (2016), que investigou a suplementação de curcumina em fêmeas de ratas ovariectomizadas, os autores administraram doses de 50 ou 100 mg / kg ao dia durante um período de 30 dias e perceberam uma atenuação no dano oxidativo e aumento da GSH.

8 CONCLUSÃO DA FASE 2

- A colite moderada induzida pelo SSD foi capaz de induzir mudanças histológicas características da CUI. Apesar do tratamento com curcuma não ter evitado essas alterações, compreende-se que nos grupos tratados as lesões/alterações estão presentes juntamente com áreas inalteradas, indicando a proteção parcial do tratamento;
- O grupo (CM) apresentou ganho de peso durante todo o período experimental. Por outro lado, os animais suplementados com extrato farmacêutico de curcuma apresentaram um maior ganho de peso na F1, sendo este normalizado na F2;
- O grupo (Ext_M) apresentou um efeito hiperglicêmico ao final do experimento, enquanto o grupo (CM) teve uma elevação na glicemia na fase F1 que se manteve constante até o final do tratamento, fase F2;
- A colite moderada induziu ao processo inflamatório no intestino e o tratamento normalizou os níveis das citocinas analisadas, quanto ao desequilíbrio redox, observa-se no intestino que nos grupos com colite moderada, CM e Ext_M, não apresentaram dano às membranas lipídicas.
- A colite moderada, independente do tratamento com curcuma, reduziu significativamente a proteção contra a inflamação no fígado, indicando uma maior propensão desses animais à injúria hepática, muito provavelmente pela conexão existente entre fígado e intestino. Por sua vez, o tratamento com curcuma, conseguiu melhorar os níveis de TNF- α , provavelmente para compensar a diminuição do IL10. Por conta das mudanças no perfil redox, esses animais apresentaram uma maior destruição de membranas lipídicas tanto o grupo tratado com CM como o Ext_M sendo que neste último o dano foi mais intenso que no CM indicando uma possível potencialização da colite ulcerativa em conjunto com a dieta enriquecida com curcuma.
- No tecido cardíaco o grupo tratado com extrato de curcuma apresentou um maior risco inflamatório do que o CM, o mesmo ocorreu com o perfil redox desses animais que apresentaram um maior dano em comparação ao CM, sendo desta forma desfavorável seus efeitos para o tecido cardíaco. A ação

dessa substância sobre o perfil redox em animais com colite precisa ser melhor investigada sobre a manifestação cardíaca.

- O grupo tratado com extrato de curcuma apresentou tanto ação pró-inflamatória como anti-inflamatória, no que diz respeito ao desequilíbrio redox os animais tratados com Ext_M apresentaram ações benéficas como a manutenção dos níveis de MDA dentro da normalidade. Corroborando com os resultados de MDA da fase G1, vale ressaltar que diferente da 1ª fase na 2ª fase experimental os animais estavam doentes, e por isso, com alterações inflamatórias/oxidativas sistêmicas derivadas da patologia.
- Por fim, esses dados em conjunto confirmam a necessidade de uma avaliação órgão-ampliada em estudos que visem o tratamento não-farmacológico, isto é, uma dietoterapia com antioxidantes e anti-inflamatória naturais, no tratamento da colite ulcerativa, uma vez que esta doença se caracteriza pelas diversas manifestações extraintestinais. Além disso, a coexistência de outras patologias pode interferir na eficácia do tratamento, em virtude do aumento do requerimento dessa substância, de acordo com suas ações antioxidantes e/ou anti-inflamatórias.

9 PERSPECTIVAS FUTURAS

Analisar o grupo induzido a colite ulcerativa grave com 5% por SSD, nos parâmetros histológicos, inflamatórios e no perfil redox, suplementados com *Curcuma longa* na forma de extrato farmacêutico, e comparar esses resultados com a indução a colite ulcerativa moderada a 3% por SSD.

10 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACHITEI, D. et al. Different Profile of Peripheral Antioxidant Enzymes and Lipid Peroxidation in Active and Non-active Inflammatory Bowel Disease Patients. **Springer Science+Business Media**, p. 1244–1249, 2013.

ADIWIDJAJA, J.; MCLACHLAN, A. J.; BODDY, A. V. Curcumin as a clinically-promising anti-cancer agent: pharmacokinetics and drug interactions. **Expert Opinion on Drug Metabolism and Toxicology**, v. 13, n. 9, p. 953–972, 2017.

AEBI, A. Catalase in Vitro. **Methods in Enzymology**, v. 105, n. 1947, p. 121–126, 1984.

AKRAM, M. et al. *CURCUMA LONGA* AND CURCUMIN : A REVIEW ARTICLE. **Rom. J. Biol**, v. 55, n. 2, p. 65–70, 2010.

ALEXANDROW, M. G. et al. Curcumin: A novel Stat3 pathway inhibitor for chemoprevention of lung cancer. **European Journal of Cancer Prevention**, v. 21, n. 5, p. 407–412, 2012.

ANJI, A. M. I. N. A. N. et al. Activation of Nuclear Factor Kappa B and Cytokine Imbalance in Experimental Alcoholic Liver Disease in the Rat. **Hepatology**, v. 30, n. 4, p. 934–943, 1999.

ALVES JÚNIOR, T. et al. Tissue sulfomucin and sialomucin content in colon mucosa without intestinal transit subjected to intervention with. **Acta Cir. Bras.** v. 32, n. 3, p. 182–193, 2017.

AMALRAJ, A. et al. Biological activities of curcuminoids, other biomolecules from turmeric and their derivatives - A review. **Journal of traditional and complementary medicine**, v. 7, n. 2, p. 205–233, 2017.

ARAFI, H. M. M. et al. Prophylactic role of curcumin in dextran sulfate sodium (DSS)-induced ulcerative colitis murine model. **Food and Chemical Toxicology**, v. 47, n. 6, p. 1311–1317, jun. 2009.

ARUN, N.; NALINI, N. Efficacy of turmeric on blood sugar and polyol pathway in diabetic albino rats. **Plant foods for human nutrition**, v. 57, p. 41-52, 2002.

AVCI, G. et al. Curcumin Protects Against Ischemia / Reperfusion Injury in Rat

Skeletal Muscle. **Journal of Surgical Research**, v. 172, n. 1, p. e39–e46, 2012.

BACK, I. R. et al. BODY COMPOSITION IN PATIENTS WITH CROHN'S DISEASE AND ULCERATIVE COLITIS TT - Composição corporal de pacientes com doença de Crohn e colite ulcerativa. **Arquivos de Gastroenterologia**, v. 54, n. 2, p. 109–114, 2017.

BAEK, O. S. et al. Curcumin inhibits protease-activated receptor-2 and-4-mediated mast cell activation. **Chimica Acta**, v. 338, n. 1–2, p. 135–141, 2003.

BALIGA, M. S. et al. Curcumin, an active component of turmeric in the prevention and treatment of ulcerative colitis: preclinical and clinical observations. **Food & function**, v. 3, n. 11, p. 1109–1117, nov. 2012.

BARIK, A. et al. Evaluation of a new copper(II)-curcumin complex as superoxide dismutase mimic and its free radical reactions. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 39, n. 6, p. 811–822, 2005.

BARNES, P. J.; ADCOCK, I. M. Glucocorticoid resistance in inflammatory diseases. **The lancet**. v. 373, 2009.

BARROS, D. Coloproctology Original article The epidemiological profile of inflammatory bowel disease patients on biologic therapy at a public hospital in Alagoas. **Journal of Coloproctology**, v. 34, n. 3, p. 131–135, 2014.

BAVARSAAD, K. et al. Protective effects of curcumin against ischemia-reperfusion injury in the liver. [s.l.] **Elsevier Ltd**, 2018.

BELOQUI, A. et al. A comparative study of curcumin-loaded lipid-based nanocarriers in the treatment of inflammatory bowel disease. **Colloids and surfaces b-biointerfaces**, v. 143, p. 327–335, jul. 2016.

BERNSTEIN, C. et al. Doença inflamatória intestinal. **World gastroenterology organization**, 2015.

BHAGAVATHULA, N. et al. A combination of curcumin and ginger extract improves abrasion wound healing in corticosteroid-impaired hairless rat skin. **Wound repair and regeneration**, v. 17, n. 3, p. 360–366, 2009.

BHATTACHARYYA, A. et al. Oxidative stress: an essential factor in the

pathogenesis of gastrointestinal mucosal diseases. **Physiological reviews**, v. 94, n. 2, p. 329-54, 2014.

BILLEREY-LARMONIER, C. et al. Protective effects of dietary curcumin in mouse model of chemically induced colitis are strain dependent. **Inflammatory bowel diseases**, v. 14, n. 6, p. 780–793, jun. 2008.

BINION, D. G. et al. Vascular cell adhesion molecule-1 expression in human intestinal microvascular endothelial cells is regulated by PI 3-kinase/Akt/MAPK/NF-kappaB: inhibitory role of curcumin. **American journal of physiology**. v. 297, n. 2, p. G259--68, 2009.

BOONLA, C. et al. Clinica Chimica Acta In fl ammatory and fi brotic proteins proteomically identi fi ed as key protein constituents in urine and stone matrix of patients with kidney calculi. **Gastrointestinal and liver physiology**. v. 429, p. 81–89, 2014.

BRADFORD, M. M. et al. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1–2, p. 248–254, 1976.

BRADLEY, P.; CHRISTENSEN, D. Cellular and Extracellular M yeloperoxidase in Pyogenic Inflammation. **blood journal**, v. 60, n. 3, p. 618–623, 2018.

CAMACHO-BARQUERO, L. et al. Curcumin, a *Curcuma longa* constituent, acts on MAPK p38 pathway modulating COX-2 and iNOS expression in chronic experimental colitis. **International immunopharmacology**, v. 7, n. 3, p. 333–342, mar. 2007.

CAMATARI, F. O. *Determinação de curcuminoides e avaliação da capacidade antioxidante contra espécies reativas de oxigênio e nitrogênio de extratos de curcuma longa e constituintes isolados*. 2017 **tese de doutorado química e biotecnologia**. (Instituto de Química e Biotecnologia), Universidade Federal de Alagoas. Alagoas.

CHUENG SAMARN, S. et al. Reduction of atherogenic risk in patients with type 2 diabetes by curcuminoid extract: a randomized controlled trial. **Journal of nutritional biochemistry**, v. 25, n. 2, p. 144–150, 2014.

CLARAMUNT, R. M. et al. Synthesis and biological evaluation of curcuminoid pyrazoles as new therapeutic agents in inflammatory bowel disease: Effect on matrix metalloproteinases. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 17, n. 3, p. 1290–1296, 2009.

COMPAGNONI, M.; MARIA, T.; GARLET, B. Desenvolvendo e divulgando o conhecimento sobre plantas medicinais Developing and disseminating knowledge on medicinal plants. **Reget/ufsm**, v. 20, n. 1, p. 438–448, 2016.

COONEY, J. M. et al. A combined omics approach to evaluate the effects of dietary curcumin on colon inflammation in the Mdr1a(-/-) mouse model of inflammatory bowel disease. **Journal of nutritional biochemistry**, v. 27, p. 181–192, jan. 2016.

DA CRUZ, G. M. G. et al. Exame histopatológico em espécimes de doença hemorroidária operada: revisão de 2.134 casos TT - Histopathologic examination of hemorrhoids: review of 2.134 cases of hemorrhoidectomy. **Revista Brasileira de Coloproctologia**, v. 27, n. 3, p. 269–277, 2007.

DE BARROS, P. A. C.; DA SILVA, A. M. R.; LINS NETO, M. Á. D. F. The epidemiological profile of inflammatory bowel disease patients on biologic therapy at a public hospital in Alagoas TT - Perfil epidemiológico dos pacientes portadores de Doença Inflamatória Intestinal, que fazem uso da terapia biológica, atend. **Journal of Coloproctology (Rio de Janeiro)**, v. 34, n. 3, p. 131–135, 2014.

DE LIMA, F. D. V. et al. Oscilação do humor em pacientes com doença de Crohn: incidência e fatores associados TT - Mood swings in patients with Crohns disease: incidence and associated factors. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 58, n. 4, p. 481–488, 2012.

DE MORAES, F. B. et al. Garrés sclerosing osteomyelitis: case report TT - Osteomielite esclerosante de Garrè: relato de caso. **Revista Brasileira de Ortopedia**, v. 49, n. 4, p. 401–404, 2014.

DE SOUZA, H. N. et al. Níveis baixos de 25-hidroxivitamina D (25OHD) em pacientes com doença inflamatória intestinal e sua correlação com a densidade mineral óssea TT - Low levels of 25-hydroxyvitamin D (25OHD) in patients with inflammatory bowel disease and its cor. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 52, n. 4, p. 684–691, 2008.

DE SOUZA, M. M. et al. Qualidade de vida de pacientes portadores de doença inflamatória intestinal TT - Quality of life of patients with inflammatory bowel disease TT - Calidad de vida de pacientes portadores de enfermedad inflamatoria intestinal. **Acta Paulista de Enfermagem**, v. 24, n. 4, p. 479–484, 2011.

DE SOUZA, M. M.; BELASCO, A. G. S.; DE AGUILAR-NASCIMENTO, J. E. Perfil epidemiológico dos pacientes portadores de doença inflamatória intestinal do estado de Mato Grosso TT - The epidemiological profile of patients with inflammatory Bowel disease in the State of Mato Grosso. **Revista Brasileira de Coloproctologia**, v. 28, n. 3, p. 324–328, 2008.

EPSTEIN, J. et al. Curcumin suppresses p38 mitogen-activated protein kinase activation, reduces IL-1beta and matrix metalloproteinase-3 and enhances IL-10 in the mucosa of children and adults with inflammatory bowel disease. **The British journal of nutrition**, v. 103, n. 6, p. 824–832, mar. 2010.

ESATBEYOGLU, T. et al. Curcumin-from molecule to biological function. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 51, n. 22, p. 5308–5332, 2012.

FANG, H. et al. Electronic Commerce Research and Applications Towards effective online review systems in the Chinese context : A cross-cultural empirical study. **Electronic commerce research and applications**, 2013.

FARHANGKHOEE, H. et al. Differential effects of curcumin on vasoactive factors in the diabetic rat heart. **Nutrition and Metabolism**, v. 3, p. 1–8, 2006a.

FARHANGKHOEE, H. et al. Nutrition & Metabolism Differential effects of curcumin on vasoactive factors in the diabetic rat heart. v. 8, p. 1–8, 2006b.

FAROMBI, E. O. et al. Curcumin and kolaviron ameliorate di-n-butylphthalate-induced testicular damage in rats. **Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology**, v. 100, n. 1, p. 43–48, 2007.

FOGLIO, M. A. et al. Plantas Medicinais como Fonte de Recursos Terapêuticos : Um Modelo Multidisciplinar. **MultiCiencia**, v. 7, n. 1, p. 8, 2006.

FOGLIO, Mary Ann. et al. Plantas Medicinais como Fonte de Recursos Terapêuticos: Um Modelo Multidisciplinar. **Divisão de Fitoquímica, CPQBA/UNICAMP**. Campinas – SP. Disponível em:

http://www.multiciencia.unicamp.br/artigos_07/a_04_7.pdf Acesso em: 05 dez. 2018.

FOK, M. L. et al. Life expectancy at birth and all-cause mortality among people with personality disorder. **Journal of Psychosomatic Research**, v. 73, n. 2, p. 104–107, 2012.

FOUSEKIS, F. S.; THEOPISTOS, V. I.; KATSANOS, K. H. Hepatobiliary Manifestations and Complications in Inflammatory Bowel Disease : A Review. **Gastroenterol Res.**, v. 11, n. 2, p. 83–94, 2018.

FRANK, J. et al. Transepithelial Transport of Curcumin in Caco-2 Cells Is significantly Enhanced by Micellar Solubilisation. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 72, n. 1, p. 48–53, 2017.

GALIC, M. A.; RIAZI, K.; PITTMAN, Q. J. Cytokines and brain excitability. **Canadian Institutes of Health Research**, v. 33, n. 1, p. 116–125, 2013.

GIANNESSI, F. et al. Curcumin protects Leydig cells of mice from damage induced by chronic alcohol administration. **Medical science monitor : international medical journal of experimental and clinical research**, v. 14, n. 11, p. BR237-42, 2008.

GARCOVICH, M. et al. Prevention and treatment of hepatic encephalopathy: focusing on gut microbiota. **World J Gastroenterol**, v. 18, n. 46, p. 6693 - 700, 2012.

GONZÁLEZ-LAMA, Y. et al. Impact of endoscopic monitoring in postoperative Crohns disease patients already receiving pharmacological prevention of recurrence. **Revista Española de Enfermedades Digestivas**, v. 107, n. 10, p. 586–590, 2015.

GOPU, B. et al. Protective Role of Curcumin and Flunixin Against Acetic Acid-Induced Inflammatory Bowel Disease via Modulating Inflammatory Mediators and Cytokine Profile in Rats. **Journal of environmental pathology toxicology and oncology**, v. 34, n. 4, p. 308–319, 2015.

GRIESSER, M. et al. Autoxidative and cyclooxygenase-2 catalyzed transformation of the dietary chemopreventive agent curcumin. **Journal of Biological Chemistry**,

v. 286, n. 2, p. 1114–1124, 2011.

GUAN, Y. et al. Therapeutic effects of curcumin nanoemulsions on prostate cancer. **Journal of huazhong university of science and technology-medical sciences**, v. 37, n. 3, p. 371–378, jun. 2017.

GUGULOTHU, D. et al. pH-Sensitive Nanoparticles of Curcumin-Celecoxib Combination: Evaluating Drug Synergy in Ulcerative Colitis Model. **Journal of pharmaceutical sciences**, v. 103, n. 2, p. 687–696, 2014.

GIUSTARINI, D. et al. Free Radical Biology and Medicine Glutathione , glutathione disul fi de , and S -glutathionylated proteins in cell cultures. **Free Radical Biology and Medicine**. v. 89, p. 972–981, 2015.

GIUSTARINI, D. et al. Assessment of glutathione/glutathione disulphide ratio and Sglutathionylated proteins in human blood, solid tissues, and cultured cells. **Free radical biology and medicine**, v. 112, n. 4, p. 360–375, 2017

GROTTO, D. et al. AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DO MARCADOR PLASMÁTICO DO ESTRESSE OXIDATIVO - MALONDIALDEÍDO. **Química Nova**, v. 31, n. 2, p. 275–279, 2008.

GUPTA, S. C. et al. Downregulation of tumor necrosis factor and other proinflammatory biomarkers by polyphenols. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 559, n. SI, p. 91–99, 2014.

HALPIN, S. J.; FORD, A. C. Prevalence of Symptoms Meeting Criteria for Irritable Bowel Syndrome in Infl ammatory Bowel Disease : Systematic Review and Meta-Analysis. **The american journal of gastroenterology**, v. 107, n. 10, p. 1474–1482, 2012.

HANAI, H. et al. Curcumin maintenance therapy for ulcerative colitis: Randomized, multicenter, double-blind, placebo-controlled trial. **Clinical gastroenterology and hepatology**, v. 4, n. 12, p. 1502–1506, 2006.

HANAI, H.; SUGIMOTO, K. Curcumin has Bright Prospects for the Treatment of Inflammatory Bowel Disease. **Current pharmaceutical design**, v. 15, n. 18, p. 2087–2094, jun. 2009.

HATCHERA. Review Curcumin : **From ancient medicine to current clinical trials**.

v. 65, p. 1631–1652, 2008.

HOLT, P. R.; KATZ, S.; KIRSHOFF, R. Curcumin therapy in inflammatory bowel disease: A pilot study. **Digestive diseases and sciences**, v. 50, n. 11, p. 2191–2193, nov. 2005.

HONG, J. H. et al. The effects of curcumin on the invasiveness of prostate cancer in vitro and in vivo. **Prostate Cancer and Prostatic Diseases**, v. 9, n. 2, p. 147–152, 2006.

HUANG, R.; BENMASSAOUD, A.; MAYRAND, S. Severe Cytomegalovirus Infection Masquerading as Recurrent Ischemic Colitis in a Patient with End-Stage Renal Disease. **ACG Case Reports Journal**. v. 4, p. 4–5, 2017.

HUANG, Z. et al. Curcumin reverses corticosterone-induced depressive-like behavior and decrease in brain BDNF levels in rats. **Neuroscience Letters**, v. 493, n. 3, p. 145–148, 2011.

HUSSEIN, H.K.; ABU-ZINADAH, O.A. Antioxidant effect of curcumin extracts in induced diabetic wister rats. **International journal zoological research**, v. 6, p. 266-276, 2010.

INGÓLFSSON, H. I. et al. Phytochemicals perturb membranes and promiscuously alter protein function. **ACS Chemical Biology**, v. 9, n. 8, p. 1788–1798, 2014.

IRVING, G. R. B. et al. Curcumin: The potential for efficacy in gastrointestinal diseases. **Best practice & research in clinical gastroenterology**, v. 25, n. 4–5, p. 519–534, 2011.

JAGETIA, G. C.; RAJANIKANT, G. K. Acceleration of wound repair by curcumin in the excision wound of mice exposed to different doses of fractionated γ radiation. **International Wound Journal**, v. 9, n. 1, p. 76–92, 2012.

JEE, S. H. et al. Curcumin induces a p53-dependent apoptosis in human basal cell carcinoma cells. **J Invest Dermatol**, v. 111, n. 4, p. 656–661, 1998.

JEENGAR, M. K. et al. Uridine Ameliorates Dextran Sulfate Sodium (DSS)-Induced Colitis in Mice. **Scientific reports**, v. 7, jun. 2017.

JIAN, Y. et al. Modulation of intestinal mucosal inflammatory factors by curcumin in

rats with colitis. **J First Mil Med Univ**, v. 24, n. 12, p. 1353–1357, 2004.

JOSHI, D. et al. Experimental and Toxicologic Pathology Curcuma longa Linn . extract and curcumin protect CYP 2E1 enzymatic activity against mercuric chloride-induced hepatotoxicity and oxidative stress : A protective approach. **Experimental and Toxicologic Pathology**, n. 2016, p. 1–10, 2017.

JURENKA, J. S. Anti-inflammatory Properties of Curcumin, a Major Constituent of *Curcuma longa*: A Review of Preclinical and Clinical Research. **Alternative medicine review**, v. 14, n. 2, p. 141–153, jun. 2009.

KADRI, C. J. et al. Anti-inflammatory effects of enemas containing an oily extract of curcumin in an experimental model of diversion colitis. **Histology and histopathology**, v. 32, n. 2, p. 161–169, 2017.

KADRI, Y. et al. Protective effects of *Curcuma longa* against neurobehavioral and neurochemical damage caused by cerium chloride in mice. **Environmental Science and Pollution Research**, n. 2012, p. 1–11, 2018.

KAKKAR, V.; KAUR, I. P. Evaluating potential of curcumin loaded solid lipid nanoparticles in aluminium induced behavioural, biochemical and histopathological alterations in mice brain. **Food and Chemical Toxicology**, v. 49, n. 11, p. 2906–2913, 2011.

KAUR, K.; SHARMA, A. K.; SINGAL, P. K. Significance of changes in TNF- α and IL-10 levels in the progression of heart failure subsequent to myocardial infarction. **Cytokines and heart failure**, v. 6, n. 3, p. 106–113, 2019.

KONDAMUDI, P. K. et al. Curcumin half analog modulates interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha in inflammatory bowel disease. **Pharmacognosy magazine**, v. 11, n. 44, 2, p. S296--S302, 2015.

KUMAR, A. et al. Conundrum and Therapeutic Potential of Curcumin in Drug Delivery. **Critical reviews in therapeutic drug carrier systems**, v. 27, n. 4, p. 279–312, 2010.

KUMAR, A. et al. Isolation and characterization of bacterial endophytes of *Curcuma longa* L. **3 Biotech**, v. 6, n. 1, p. 1–8, 2016.

KUNWAR, A.; PRIYADARSINI, K. I. Curcumin and Its Role in Chronic Diseases.

Advances in Experimental Medicine and Biology. v. 928 p. 1–25. 2016.

LACRAZ, S. et al. IL-10 Inhibits Metalloproteinase and Stimulates TIMP-1 Production in Human Mononuclear Phagocytes. **The american society for clinical investigation**, v. 96, n. 1995, p. 2304–2310, 1995.

LANG, A. et al. Curcumin in Combination With Mesalamine Induces Remission in Patients With Mild-to-Moderate Ulcerative Colitis in a Randomized Controlled Trial. **Clinical gastroenterology and hepatology**, v. 13, n. 8, p. 1444+, 2015.

LANG, A.; SALOMON, N.; BEN-HORIN, S. Reply. **Clinical Gastroenterology and Hepatology**, v. 14, n. 6, p. 913–913.e2, jun. 2016.

LANGMEAD, L.; RAMPTON, D. S. Review article : complementary and alternative therapies for inflammatory bowel disease. **Alimentary pharmacology & therapeutics** p. 341–349, 2005.

LAO, C. D. et al. Dose escalation of a curcuminoid formulation. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 6, p. 4–7, 2006.

LARMONIER, C. B. et al. Modulation of Neutrophil Motility by Curcumin: Implications for Inflammatory Bowel Disease. **Inflammatory bowel diseases**, v. 17, n. 2, p. 503–515, 2011.

LEE, H. et al. L . extract ameliorate lipid accumulation through the regulation of the endoplasmic reticulum redox and ER stress. **Scientific Reports**, n. June, p. 1–14, 2017.

LEV-ARI, S. et al. Curcumin synergistically potentiates the growth inhibitory and pro-apoptotic effects of celecoxib in pancreatic adenocarcinoma cells. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 59, n. SUPPL. 2, 2005.

LI, Q. et al. Curcumin-piperine mixtures in self-microemulsifying drug delivery system for ulcerative colitis therapy. **International journal of pharmaceutics**, v. 490, n. 1–2, p. 22–31, jul. 2015.

LIJU, V. B.; JEENA, K.; KUTTAN, R. Acute and subchronic toxicity as well as mutagenic evaluation of essential oil from turmeric (*Curcuma longa* L). **Food and Chemical Toxicology**, v. 53, p. 52–61, 2013.

LIM, K. J. et al. A polymeric nanoparticle formulation of curcumin inhibits growth, clonogenicity and stem-like fraction in malignant brain tumors. **Cancer Biology and Therapy**, v. 11, n. 5, p. 464–473, 2011.

LIMA, W. et al. AVALIAÇÃO FITOQUÍMICA E ANTIOXIDANTE DE PLANTAS MEDICINAIS DO NORTE DO MATO GROSSO. **FACIDER Revista científica**, n. 2, p. 1. 2013.

LIN, S. S. et al. Curcumin inhibits the migration and invasion of human A549 lung cancer cells through the inhibition of matrix metalloproteinase-2 and -9 and Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF). **Cancer Letters**, v. 285, n. 2, p. 127–133, 2009.

LIU, L. et al. Curcumin ameliorates dextran sulfate sodium-induced experimental colitis by blocking STAT3 signaling pathway. **International immunopharmacology**, v. 17, n. 2, p. 314–320, 2013.

LIU, L. et al. Fabrication and drug releasing property of Silk Fibroin-based fibrous membrane for the treatment of Anal Fistula. (Li, Y and Padhye, R, Ed.) **TEXTILE BIOENGINEERING AND INFORMATICS SYMPOSIUM PROCEEDINGS, 2016, VOLS 1 AND 2. Anais.: Textile Bioengineering and Informatics Symposium Proceedings.2016**

LOGANES, C. et al. Curcumin Anti-Apoptotic Action in a Model of Intestinal Epithelial Inflammatory Damage. **Nutrients**, v. 9, n. 6, jun. 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.

LÜER, S. et al. Topical curcumin can inhibit deleterious effects of upper respiratory tract bacteria on human oropharyngeal cells in vitro: Potential role for patients with cancer therapy induced mucositis? **Supportive Care in Cancer**, v. 19, n. 6, p. 799–806, 2011.

YEH, C. C. et al. A study of glutathione status in the blood and tissues of patients with breast cancer. **Cell biochem funct**, v. 24, n. 6, p. 555-9, 2006.

MAHESH, T.; MANOHARAN, M.; BALASUBASHINI, S. Photo-Irradiated Curcumin

Supplementation in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats : Effect on Lipid Peroxidation Supplémentation en curcumine photo-irradiée chez le rat rendu diabétique par la streptozotocine : effets sur la peroxydation lipidique. **Thérapie**, v. 59, n. 6, p. 639–644, 2004.

MANUEL SANCHEZ-CALVO, J. et al. Protective Effect of Curcumin, a *Curcuma longa* Constituent, in Early Colonic Inflammation in Rats. **Drug development research**, v. 70, n. 6, p. 425–437, 2009.

MARANHÃO, DÉBORA DAVALOS DE ALBUQUERQUE; VIEIRA, ANDREA; CAMPOS, T. Características e diagnóstico diferencial das doenças inflamatórias intestinais. **J. Bras. Med**, v. 103, n. 1, p. 9–15, 2015.

MARQUES, A. H.; CIZZA, G.; STERNBERG, E. Interações imunocerebrais e implicações nos transtornos psiquiátricos Brain-immune interactions and implications in psychiatric disorders. **Rev Bras Psiquiatr.**, v. 29, n. Supl I, p. 27–32, 2007.

MATHURIA, N.; VERMA, R. J. Curcumin ameliorates aflatoxin-induced toxicity in mice spermatozoa. **Fertility and Sterility**, v. 90, n. 3, p. 775–780, 2008.

MCCANN, M. J. et al. 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, 2014.

MCFADDEN, T. et al. The Role of Curcumin in Modulating Colonic Microbiota During Colitis and Colon Cancer Prevention. **Inflamm Bowel**, v. 21, n. 11, p. 2483–2494, 2016.

MEDHI, B. et al. Effect of Manuka honey and sulfasalazine in combination to promote antioxidant defense system in experimentally induced ulcerative colitis model in rats. **Indian Journal of Experimental Biology**. v. 46, n. August, p. 583–590, 2008.

MESSNER, D. J.; SIVAM, G.; KOWDLEY, K. V. Curcumin reduces the toxic effects of iron loading in rat liver epithelial cells. **Liver International**. p. 63–72, 2008.

MIDURA-KIELA, M. T. et al. Curcumin inhibits interferon-gamma signaling in colonic

epithelial cells. **American journal of physiology-gastrointestinal and liver physiology**, v. 302, n. 1, p. G85--G96, jan. 2012.

MONDAL, S.; GHOSH, S.; MOULIK, S. P. Stability of curcumin in different solvent and solution media: UV-visible and steady-state fluorescence spectral study. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 158, p. 212–218, 2016.

MORIMOTO, T. et al. The dietary compound curcumin inhibits p300 histone acetyltransferase activity and prevents heart failure in rats. **Journal of Clinical Investigation**, v. 118, n. 3, p. 868–878, 2008.

MORRONE, M. et al. Oral administration of curcumin relieves behavioral alterations and oxidative stress in the frontal cortex , hippocampus , and striatum of ovariectomized Wistar rats. **Nutritional Biochemistry**, v. 4, n. April, p. 1–23, 2016.

MOTAWI, T. K.; RIZK, S. M.; SHEHATA, A. H. Effects of curcumin and Ginkgo biloba on matrix metalloproteinases gene expression and other biomarkers of inflammatory bowel disease. **Journal of physiology and biochemistry**, v. 68, n. 4, p. 529–539, 2012.

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

MOUZAOU, S.; RAHIM, I.; DJERDJOURI, B. Aminoguanidine and curcumin attenuated tumor necrosis factor (TNF)-alpha-induced oxidative stress, colitis and hepatotoxicity in mice. **International immunopharmacology**, v. 12, n. 1, p. 302–311, jan. 2012.

NA, L. X. et al. Curcumin improves insulin resistance in skeletal muscle of rats. **Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases**, v. 21, n. 7, p. 526–533, 2011.

NAITO, Y.; TAKAGI, T.; YOSHIKAWA, T. Neutrophil-dependent oxidative. **Clinic Biochememical Nutrition**, v.41, n. 1, p. 18-26, 2007.

NAMRATHA, K. et al. Antioxidant and Anticancer effects of curcumin – A Review
Zerdeçalın Antioksidan ve Antikanser Etkileri – **Derleme Introduction**. v. 3, n. 2, p. 136–143, 2013.

- NELSON, K. M. et al. The Essential Medicinal Chemistry of Curcumin. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 60, n. 5, p. 1620–1637, 2017.
- NISHIYAMA, T. et al. Curcuminoids and sesquiterpenoids in turmeric (*Curcuma longa* L.) suppress and increase in blood glucose level in type 2 diabetic KK-Ay mice. **Agricultural and food chemistry**, v. 53, p. 959-963, 2005.
- NG, M. et al. Global , regional , and national prevalence of overweight and obesity in children and adults during 1980 – 2013 : a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study. **The lancet**. 2013. v. 384, 2014.
- NGG, Z. L.; QIANGSONG, T. N. G.; CUIHUAN, W. U. Growth-inhibitory Effects of Curcumin on Ovary Cancer Cells and Its Mechanisms. **Jornal Of Huazhong University of Science and Technology**. v. 24, n. 1, p. 55–58, 2004.
- NONN, L.; DUONG, D.; PEEHL, D. M. Chemopreventive anti-inflammatory activities of curcumin and other phytochemicals mediated by MAP kinase phosphatase-5 in prostate cells. **Carcinogenesis**, v. 28, n. 6, p. 1188–1196, 2007.
- NOORAFSHAN, A. et al. Ameliorative effects of curcumin on the structural parameters of seminiferous tubules and Leydig cells in metronidazole-treated mice: A stereological approach. **Experimental and Toxicologic Pathology**, v. 63, n. 7–8, p. 627–633, 2011.
- NOORAFSHAN, A.; ASHKANI-ESFAHANI, S. A Review of Therapeutic Effects of Curcumin. **Current pharmaceutical design**, v. 19, n. 11, p. 2032–2046, 2013.
- OHNO, M. et al. Nanoparticle curcumin ameliorates experimental colitis via modulation of gut microbiota and induction of regulatory T cells. **Plos One**. v. 6, p. 1–16, 2017.
- PAWAR, P. et al. Rectal gel application of *Withania somnifera* root extract expounds anti-inflammatory and muco-restorative activity in TNBS-induced Inflammatory Bowel Disease. **Bmc complementary and alternative medicine**, v. 11, 2011.
- PICK, E.; KEISARI, Y. A SIMPLE COLORIMETRIC METHOD FOR THE MEASUREMENT OF HYDROGEN PEROXIDE PRODUCED BY CELLS IN CULTURE. **Journal of Immunological Methods**, v. 38, n. 1505, p. 161–170, 1980.

PINTÃO, A. M.; SILVA, I. F. DA. Resumo As plantas e os produtos naturais delas derivados têm sido utilizados ao longo da História e no mundo com variados fins . A medicina com base em plantas desempenhou um papel fundamental na sobrevivência de v. **Workshop Plantas Medicinais e Fitoterapêuticas nos Trópicos**, 2008.

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 Research and Treatment**, v. 46, n. 1, p. 2–18, 2014.

PURKAYASTHA, S. et al. Curcumin blocks brain tumor formation. **Brain Research**, v. 1266, n. 10 mM, p. 130–138, 2009.

QURESHI, M. et al. Therapeutic potential of curcumin for multiple sclerosis. **Neurol Sci**. v 7, p. 2-8. 2017.

RACHMAWATI, H. et al. Multiple Functions of D- α -Tocopherol Polyethylene Glycol 1000 Succinate (TPGS) as Curcumin Nanoparticle Stabilizer : In Vivo Kinetic Profile and Anti-Ulcerative Colitis Analysis in Animal Model. **Pharmaceutics**. p. 1–13, 2017.

RAHIMI, R.; SHAMS-ARDEKANI, M. R.; ABDOLLAHI, M. A review of the efficacy of traditional Iranian medicine for inflammatory bowel disease. **World jornal of Gastroenterogy**. v. 16, n. 36, p. 4504–4514, 2010.

RAMOS-MARTÍNEZ, A. et al. Risk factors for Clostridium difficile diarrhea in patients with inflammatory bowel disease TT - Factores de riesgo de diarrea por Clostridium difficile en pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal. **Revista Española de Enfermedades Digestivas**, v. 107, n. 1, p. 4–9, 2015.

RICHARD G. CUTLER, "Oxidative Stress and Aging: Catalase Is a Longevity Determinant Enzyme", **Rejuvenation research**, v.8 n. 3, p. 138-140, 2005.

ROJAS-FERIA, M. et al. Hepatobiliary manifestations in inflammatory bowel disease : The gut , the drugs and the liver. **World jornal of Gastroenterogy**, v. 19, n. 42, p. 7327–7340, 2013.

ROSELLÓ, D. M. et al. encephalopathy model : protective effects of curcumin. **Hepatology Research**. v. 38, p. 1148–1153, 2008.

RUTGEERTS, P. et al. Basic and clinical reviews in basic and clinical. **Ygast**, v. 136, n. 4, p. 1182–1197, 2009.

SALOMON, N. et al. Curcumin, but not mesalamine, inhibits activated T-cells: Implications for combo curcumin-mesalamine UC therapy. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**, v. 28, n. 3, p. 585, 2013.

SALOMON, N. et al. Curcumin Add-on Therapy for Remission Induction in Mild-moderate Active Ulcerative Colitis: A Multi-center, Randomized, Placebo-Controlled Trial. **Clinical Gastroenterology and Hepatology**, v. 13, n. 7, p. 1381–1382, jul. 2015.

SALVIANO, F. N.; BURGOS, M. G. P. DE A.; SANTOS, E. C. Perfil socioeconômico e nutricional de pacientes com doença inflamatória intestinal internados em um hospital universitário TT - Socioeconomic and nutritional profile of patients with inflammatory bowel disease at a university hospital. **Arquivos de Gastroenterologia**, v. 44, n. 2, p. 99–106, 2007.

SAREEN, R.; JAIN, N.; DHAR, K. L. Curcumin-Zn(II) complex for enhanced solubility and stability: an approach for improved delivery and pharmacodynamic effects. **Pharmaceutical development and technology**, v. 21, n. 5, p. 630–635, 2016.

SURAI, P. F. Antioxidant Systems in Poultry Biology: Superoxide Dismutase. **Journal of Animail Research and Nutrition**, v. 1, n. 8, p. 1–17, 2016.

SCHNEIDER, C. et al. Degredation of curcumin: From mechanism to biological implications. **J Agric Food Chem**, v. 63, n. 35, p. 7606–7614, 2015.

SHAO, J. et al. Screening of the optimized prescription from Suqingwan in terms of its therapeutic effect on DSS-induced ulcerative colitis by its regulation of inflammatory and oxidative mediators. **JOURNAL OF ETHNOPHARMACOLOGY**, v. 202, p. 54–62, 2017.

SHARMA, S.; KULKARNI, S. K.; CHOPRA, K. Curcumin, the active principle of turmeric (*Curcuma longa*), ameliorates diabetic nephropathy in rats. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 33, n. 10, p. 940–945, 2006.

SHOME, S. et al. Curcumin as potential therapeutic natural product: a

nanobiotechnological perspective. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 68, n. 12, p. 1481–1500, 2016.

SHUKLA, P. K. et al. Anti-ischemic effect of curcumin in rat brain. **Neurochemical Research**, v. 33, n. 6, p. 1036–1043, 2008.

SINGH, S.; KHAR, A. Biological Effects of Curcumin and Its Role in Cancer Chemoprevention and Therapy. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**, v. 6, p. 259–270, 2006.

SINGH, U. P. et al. Alternative Medicines as Emerging Therapies for Inflammatory Bowel Diseases. **International Reviews of Immunology**, v. 31, n. 1, p. 66–84, 2012.

SINGLA, V. et al. Induction with NCB-02 (curcumin) enema for mild-to-moderate distal ulcerative colitis - A randomized, placebo-controlled, pilot study. **Journal of crohns & colitis**, v. 8, n. 3, p. 208–214, mar. 2014.

SIVIERO, A. et al. Curcumin, a golden spice with a low bioavailability. **Journal of Herbal Medicine**, v. 5, n. 2, p. 57–70, 2015.

SOLEIMANI, V.; SAHEBKAR, A.; HOSSEINZADEH, H. Turmeric (*Curcuma longa*) and its major constituent (curcumin) as nontoxic and safe substances: Review. **Phytotherapy Research**, n. September 2017, p. 1–11, 2018.

SONG, W.-B. et al. Curcumin Protects Intestinal Mucosal Barrier Function of Rat Enteritis via Activation of MKP-1 and Attenuation of p38 and NF-kappa B Activation. **Plos one**, v. 5, n. 9, 2010.

STANIĆ, Z. Curcumin, a Compound from Natural Sources, a True Scientific Challenge – A Review. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 72, n. 1, 2017.

SUETH-SANTIAGO, V. et al. Curcumina, o pó dourado do açafrão-da-terra: Introspecções sobre química e atividades biológicas. **Quimica Nova**, v. 38, n. 4, p. 538–552, 2015.

SUGIMOTO, K. et al. Curcumin prevents and ameliorates trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis in mice. **Gastroenterology**, v. 123, n. 6, p. 1912–1922, 2002.

SURYANARAYANA, P. et al. Effect of turmeric and curcumin on oxidative stress

and antioxidant enzymes in streptozotocin-induced diabetic rat. **medscimonit**, v. 13, n. 12, p. 286–292, 2007.

SURAI, P. F. Antioxidant Systems in Poultry Biology: Superoxide Dismutase. **Journal of Animal Research and Nutrition**, v. 1, n. 8, p. 1–17, 2016.

SUSKIND, D. L. et al. Tolerability of Curcumin in Pediatric Inflammatory Bowel Disease: A Forced-Dose Titration Study. **Journal of pediatric gastroenterology and nutrition**, v. 56, n. 3, p. 277–279, mar. 2013.

TATUM, V. L.; CHANGCHIT, C. K.; CHOW, C. K. Measurement of Malondialdehyde by High Performance Liquid Chromatography with Fluorescence Detection. **Lipids**, v. 25, n. 4, p. 226–229, 1990.

TODEN, S. et al. Essential turmeric oils enhance anti-inflammatory efficacy of curcumin in dextran sulfate sodium-induced colitis. **Scientific reports**, v. 7, 2017.

TOPCU-TARLADACALISIR, Y. et al. Effects of Curcumin on Apoptosis and Oxidoinflammatory Regulation in a Rat Model of Acetic Acid-Induced Colitis: The Roles of c-Jun N-Terminal Kinase and p38 Mitogen-Activated Protein Kinase. **Journal of medicinal food**, v. 16, n. 4, p. 296–305, 2013.

TRIVEDI, P.P.; JENA, G.B. Dextran sulfate sodium-induced ulcerative colitis leads to increased hematopoiesis and induces both local as well as systemic genotoxicity in mice. **Mutation research**, v. 744, n.2, p. 172-183, 2012.

TRUJILLO, J. et al. Renoprotective effect of the antioxidant curcumin: Recent findings. **Redox Biology**, v. 1, n. 1, p. 448–456, 2013.

UCHIO, R. et al. A hot water extract of turmeric (*Curcuma longa*) suppresses acute ethanol-induced liver injury in mice by inhibiting hepatic oxidative stress and inflammatory cytokine production. **Journal of nutritional science**, v. 6, n. 3, p. 1–9, 2017.

UKIL, A. et al. Curcumin, the major component of food flavour turmeric, reduces mucosal injury in trinitrobenzene sulphonic acid-induced colitis. **British journal of pharmacology**, v. 139, n. 2, p. 209–218, 2003.

UNG, V. Y. L. 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. **Digestive diseases and sciences**, v. 55, n. 5, p. 1272–1277, 2015.

UNO, J. K. et al. The role of tumor necrosis factor alpha in down-regulation of osteoblast PheX gene expression in experimental murine colitis. **Gastroenterology**, v. 131, n. 2, p. 497–509, 2006.

UPPENDAHL, L. D. et al. Natural Killer Cell-Based Immunotherapy in Gynecologic Malignancy : A Review. **Frontiers in immunology**, v.8, n. 1, p. 1825, 2018.

VAN NONG, H. et al. Fabrication and vibration characterization of curcumin extracted from turmeric (*Curcuma longa*) rhizomes of the northern Vietnam. **Springer Plus**, v. 5, n. 1, 2016.

VICTORIA, C. R.; SASSAK, L. Y.; NUNES, H. R. DE C. Incidence and prevalence rates of inflammatory bowel diseases, in midwestern of São Paulo State, Brazil. **Arquivos de Gastroenterologia**, v. 46, n. 1, p. 20–25, 2009a.

VICTORIA, C. R.; SASSAK, L. Y.; NUNES, H. R. DE C. Incidence and prevalence rates of inflammatory bowel diseases, in midwestern of São Paulo State, Brazil TT - Incidência e prevalência das doenças inflamatórias intestinais na região centro-oeste do Estado de São Paulo. **Arquivos de Gastroenterologia**, v. 46, n. 1, p. 20–25, 2009.

WANG, J.; GHOSH, S. S.; GHOSH, S. Curcumin improves intestinal barrier function: modulation of intracellular signaling, and organization of tight junctions. **American journal of physiology-cell physiology**, v. 312, n. 4, p. C438--C445, 2017.

WONGEAKIN, N. et al. Effects of curcumin and tetrahydrocurcumin on diabetes induced endothelial dysfunction. **African Journal of Biochemistry**, v. 3, n. 5, p. 259–265, 2009.

XIAO, B. et al. Combination Therapy for Ulcerative Colitis: Orally Targeted Nanoparticles Prevent Mucosal Damage and Relieve Inflammation. **Theranostics**, v. 6, n. 12, p. 2250–2266, 2016.

YANG, H. et al. Structure-Activity Relationship of Curcumin: Role of the Methoxy Group in Anti-inflammatory and Anticolitis Effects of Curcumin. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 65, n. 22, p. 4509–4515, jun. 2017.

YANG, K. Y. et al. Oral bioavailability of curcumin in rat and the herbal analysis from *Curcuma longa* by LC-MS/MS. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 853, n. 1–2, p. 183–189, 2007.

YILDIRIM, H. et al. In vivo effects of curcumin on the paraoxonase, carbonic anhydrase, glucose-6-phosphate dehydrogenase and beta-glucosidase enzyme activities in dextran sulphate sodium-induced ulcerative colitis mice. **Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry**, v. 31, n. 6, p. 1583–1590, 2016.

YOUSEF, M. I. et al. Potential protective effects of quercetin and curcumin on paracetamol-induced histological changes, oxidative stress, impaired liver and kidney functions and haematotoxicity in rat. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, n. 11, p. 3246–3261, 2010.

YOUSEF, M. I.; EL-DEMERDASH, F. M.; RADWAN, F. M. E. Sodium arsenite induced biochemical perturbations in rats : Ameliorating effect of curcumin. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 11, p. 3506–3511, 2008.

YU, Y. et al. The effect of curcumin on the brain-gut axis in rat model of irritable bowel syndrome: involvement of 5-HT-dependent signaling. **Metabolic brain disease**, v. 30, n. 1, p. 47–55, 2015.

YUE, Y. et al. The application of natural drug-curcumin in the detection hypochlorous acid of real sample and its bioimaging. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 202, p. 551–556, 2014.

YULIANI, S.; MUSTOFA; PARTADIREDA, G. The neuroprotective effects of an ethanolic turmeric (*Curcuma longa* L .) extract against trimethyltin-induced oxidative stress in rats The neuroprotective effects of an ethanolic turmeric (*Curcuma longa* L .) extract against trimethyltin-induced oxidativ. **Nutritional Neuroscience**, v. 0, n. 7, p. 1–8, 2018.

ZHANG, D. et al. Curcumin and Diabetes : A Systematic Review. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, p. 16, 2013.

ZENG, Z. et al. Curcumin Improves TNBS-Induced Colitis in Rats by Inhibiting IL-27 Expression via the TLR4/NF-kappa B Signaling Pathway. **Planta medica**, v. 79, n. 2, p. 102–109, jan. 2013.

- ZHAO, H.-M. et al. Curcumin Suppressed Activation of Dendritic Cells via JAK/STAT/SOCS Signal in Mice with Experimental Colitis. **Frontiers in pharmacology**, v. 7, nov. 2016.
- ZHAO, H.-M. et al. Therapeutic effect of curcumin on experimental colitis mediated by inhibiting CD8(+)CD11c(+) cells. **World journal of gastroenterology**, v. 23, n. 10, p. 1804–1815, mar. 2017.
- ZHU, H.; LI, R.; LINGLONG, K. Multivariate varying coefficient model for functional responses. **The Annals of Statistics**. v. 40, n. 5, p. 2634–2666, 2012.
- WILLIAM, I. hemokine Receptors and Leukocyte Trafficking in the Mucosal Immune System. **Immunologic research** v. 1, n. 3, p. 283–291, 2004.

11 ANEXOS

Anexo 1



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

PARECER CONSUBSTANCIADO

PROJETO Nº 44 /2015

TÍTULO: Efeitos terapêuticos do pó e do extrato da *Curcuma longa* sobre a colite ulcerativa induzida por sulfato de sódio dextrano.

RESPONSÁVEL: Fabiana Andréa Moura

OBJETIVO: Avaliar o efeito da suplementação dietética de *Curcuma longa* nas formas de pó e extrato sobre a resposta antioxidante e inflamatória em camundongos com colite ulcerativa induzida por sulfato de sódio dextrano.

SITUAÇÃO: Aprovado

PERÍODO DE VIGÊNCIA: 05.10.2015 a 21.02.2016

DADOS DO ANIMAL:

ESPÉCIE	LINHAGEM	QUANTIDADE
Camundongo heterogênico	Swiss	66 machos

Maceió, 14 de agosto de 2015.

Prof. Dra. Silvana Ayres Martins

Coordenadora da Comissão de
Ética no uso de Animais
SIAPE 1120858