

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
ESCOLA DE VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E ATIVIDADE DA *CURCUMA LONGA* L. EM CÉLULAS ENDOTELIAIS SOB ESTRESSE OXIDATIVO

Juliana Carvalho de Almeida Borges Teles
Orientador: Prof. Dr. Eugênio Gonçalves de Araújo

GOIÂNIA
2020



**TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR
VERSÕES ELETRÔNICAS DE TESES E DISSERTAÇÕES
NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG**

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

O conteúdo das dissertações e teses disponibilizados são de responsabilidade exclusiva dos autores. Ao encaminhar(em) o produto final, o autor e o orientador firmam o compromisso de que ele não contém nenhuma violação de quaisquer direitos autorais ou outro direito de terceiros.

1. Identificação do material bibliográfico: [] Dissertação [X] Tese

2. Identificação da Tese ou Dissertação:

Nome completo do autor: Juliana Carvalho de Almeida Borges Teles

Título do trabalho: CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E ATIVIDADE DA CURCUMA LONGA L. EM CÉLULAS ENDOTELIAIS SOB ESTRESSE OXIDATIVO

3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento [X] SIM [] NÃO:

Independente da concordância com a disponibilização eletrônica, é imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF da tese ou dissertação.

Juliana Carvalho de Almeida Borges Teles
Assinatura do(a) autor(a):

Ciente e de acordo:

[Assinatura]
Assinatura do(a) orientador(a):

Data: 10/03/2020

1 Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. O documento não será disponibilizado durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente;
- Submissão de artigo em revista científica;
- Publicação como capítulo de livro;
- Publicação da dissertação/tese em livro.

2 As assinaturas devem ser originais sendo assinadas no próprio documento, imagens coladas não serão aceitas.

JULIANA CARVALHO DE ALMEIDA BORGES TELES

CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E ATIVIDADE DA *CURCUMA LONGA* L. EM CÉLULAS ENDOTELIAIS SOB ESTRESSE OXIDATIVO

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em Ciência Animal junto à Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás

Área de Concentração:

Cirurgia, Patologia animal e Clínica médica

Orientador:

Prof. Dr. Eugênio Gonçalves de Araújo – EVZ/UFG

Comitê de Orientação:

Dr^a. Vanessa de Sousa Cruz – EVZ/UFG

Prof. Dr. Klaus Casaro Saturnino – REJ/UFG

GOIÂNIA

2020

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Borges-Teles, Juliana Carvalho de Almeida
CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E ATIVIDADE DA
CURCUMA LONGA L. EM CÉLULAS ENDOTELIAIS SOB ESTRESSE
OXIDATIVO [manuscrito] / Juliana Carvalho de Almeida Borges
Teles. - 2020.
xix, 64 f.: il.

Orientador: Prof. Dr. Eugênio Gonçalves de Araújo; co orientadora Dra. Vanessa de Sousa Cruz; co-orientador Dr. Klaus Casaro Saturnino.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Goiás, Escola de Veterinária e Zootecnia (EVZ), Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Goiânia, 2020.

Bibliografia.

Inclui siglas, abreviaturas, lista de figuras, lista de tabelas.

1. Ácido gálico. 2. curcumina. 3. DPPH. 4. estresse oxidativo. 5. HUVEC. I. Araújo, Eugênio Gonçalves de , orient. II. Título.

CDU 63



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS

ESCOLA DE VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

ATA DE DEFESA DE TESE

Ata N° 288 da sessão de Defesa de Tese de **Juliana Carvalho de Almeida Borges** que confere o título de Doutora em **Ciência Animal**, na área de concentração em **Cirurgia, Clínica médica e Patologia Animal**.

Aos **vinte e oito dias do mês de fevereiro de dois mil e vinte** a partir da(s) **13h30min**, na(s) sala 13 do setor de Pós-Graduação da EVZ/UFG, realizou-se a sessão pública de Defesa de Tese intitulada “**Atividade antioxidante do extrato etanólico da *Curcuma longa* L. em células endoteliais sob estresse oxidativo**”. Os trabalhos foram instalados pelo Orientador, **Prof. Dr. Eugênio Gonçalves de Araújo (EVZ/UFG)** com a participação dos demais membros da Banca Examinadora: **Prof.ª Dr.ª Ana Paula Iglesias Santin (EVZ/UFG)**, membro titular externo ao programa; **Prof. Dr. Adilson Donizeti Damasceno (EVZ/UFG)** membro titular interno; **Prof. Dr. Daniel Cortês Beretta (UFJ)**, membro titular externo, cuja participação ocorreu através de videoconferência; **Prof. Dr. Diego Antônio Costa Arantes (FASAM)**, membro titular externo. Durante a arguição os membros da banca fizeram sugestão de alteração do título do trabalho conforme explicitado abaixo. A Banca Examinadora reuniu-se em sessão secreta a fim de concluir o julgamento da Tese tendo sido a candidata aprovada pelos seus membros. Proclamados os resultados pelo **Prof. Dr. Eugênio Gonçalves de Araújo**, Presidente da Banca Examinadora, foram encerrados os trabalhos e, para constar, lavrou-se a presente ata que é assinada pelos Membros da Banca Examinadora, aos vinte e oito dias do mês de fevereiro de dois mil e vinte.

TÍTULO SUGERIDO PELA BANCA

Caracterização físico-química e atividade da *Curcuma longa* L. em células endoteliais sob estresse oxidativo

Documento assinado eletronicamente por **Eugênio Gonçalves De Araújo, Professor do Magistério Superior**, em 28/02/2020, às 17:21, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do



[Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015.](#)



Documento assinado eletronicamente por **Adilson Donizeti Damasceno, Professor do Magistério Superior**, em 28/02/2020, às 17:22, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015.](#)



Documento assinado eletronicamente por **Diego Antonio Costa Arantes, Professor do Magistério Superior**, em 28/02/2020, às 17:25, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015.](#)



Documento assinado eletronicamente por **Daniel Cortes Beretta, Diretor**, em 28/02/2020, às 17:28, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015.](#)



Documento assinado eletronicamente por **Ana Paula Iglesias Santin, Coordenador de Curso**, em 28/02/2020, às 17:48, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015.](#)



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1181405** e o código CRC **F6DC8CD9**.

Referência: Processo nº 23070.004318/2020-93

SEI nº 1181405

AGRADECIMENTOS

A Deus, por todas as bênçãos que Ele derrama diariamente sobre mim e minha família.

Ao meu filho João Victor e ao meu marido Victor por todo o amor e principalmente pela compreensão da minha grande ausência no período de realização desse Doutorado.

Aos meus pais pelo incentivo aos estudos desde a infância, pelo apoio e toda a ajuda emocional e financeira, sem a qual eu não conseguiria ter chegado ao final desse trabalho.

Aos meus familiares maternos, paternos e aos familiares do meu marido, que me acolheram e apoiaram com carinho.

Ao meu orientador Prof. Dr. Eugênio Gonçalves de Araújo pela amizade, pela sabedoria transmitida, pela paciência, confiança e parceria desde 2008.

A minha amiga querida e coorientadora Dr^a. Vanessa de Sousa Cruz que me auxilia com tanto carinho e zelo desde o Mestrado. Deus é o único que pode lhe retribuir por tudo o que você fez por mim, durante todo esse tempo.

Ao meu coorientador Prof. Dr. Klaus Casaro Saturnino pelos ensinamentos, pela atenção e disponibilidade constantes.

As minhas chefias da equipe de trabalho, Prof^a. Dr^a. Mirian Machado Mendes, Dr^a Rejane Faria Ribeiro-Rotta e Prof. Dr. Jesiel Freitas Carvalho, pelo auxílio, pelo tempo e a confiança disponibilizados a mim, para concluir essa tese.

Ao Prof. Dr. Carlos Henrique Xavier Custódio e sua equipe pela disponibilidade, contribuição e auxílio no projeto piloto.

A Prof^a. Dr^a. Veridiana de Melo Rodrigues Ávila, coordenadora do Laboratório de Bioquímica e Toxinas Animais da UFU-MG pela doação das células endoteliais para a finalização dos experimentos. Agradeço imensamente por sua afabilidade e presteza.

Aos professores convidados por aceitarem colaborar com a qualidade desta tese participando da banca de avaliação.

Aos colegas de pós-graduação Patrícia de Almeida Machado Gonçalves, Daniel Graziani, Edilson Ribeiro de Oliveira Júnior, Vanessa Vieira e Claudiane Marques, pela boa convivência, pelo auxílio na execução do projeto e pela troca de experiências.

Aos amigos que o Doutorado me deu: Leandro Lopes Nepomuceno e Nayane Peixoto Soares. Agradeço imensamente a vocês pelos momentos de aprendizado, de diversão,

de consolo, de alegria e pela grandiosa colaboração durante todas as fases deste trabalho. Vocês foram essenciais nessa etapa da minha vida.

As alunas de iniciação científica Fernanda Paixão, Luísa Pinheiro Moreira, Barbara Franco Bueno Fernandes, Nathali Lacerda, Beatriz Moraes, Giulia e todos que auxiliaram nos experimentos dessa pesquisa.

Aos amigos de trabalho da UFG Regional Jataí, principalmente Márcia Pereira Dutra de Rezende e Natiely Peres pela amizade, pelo apoio e por terem sido meu porto seguro em Jataí.

Aos amigos de trabalho da PRPI/UFG/Goiânia, principalmente Cláudia Bueno Alves, Márcia Regina Araújo, Lyzyê Inácio Almeida, Luiz Fernando Gonçalves da Silva Araújo, Iuri Vaz Miranda, Larissa Santos Pereira, Juliana Carla Dalla Rosa, Izabel Maria Lopes Cunha, Izadora Araújo Barbosa pelo incentivo e por me escutarem e apoiarem nos momentos difíceis da conclusão dessa tese.

Aos meus animais de estimação Melody (*in memorian*) e Dudu por me alegrarem tanto.

Aos professores, técnicos-administrativos e demais funcionários de toda a UFG, minha eterna casa.

“A mente que se abre a uma nova ideia jamais voltará ao seu tamanho original.”

(Albert Einstein)

“Não andeis ansiosos por coisa alguma; antes em tudo sejam os vossos pedidos conhecidos diante de Deus pela oração e súplica com ações de graças; e a paz de Deus, que excede todo o entendimento, guardará os vossos corações e os vossos pensamentos em Cristo Jesus.”

Filipenses 4:6-7

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES INICIAIS.....	1
1 Injúria de isquemia e reperfusão.....	2
1.1 Alterações celulares decorrentes da isquemia.....	2
1.2 Reperfusão.....	4
2 Estresse oxidativo.....	6
2.1 Sistemas produtores de espécies reativas no tecido endotelial.....	6
2.2 Inflamação e remodelamento vascular.....	8
3 Curcumina.....	9
3.1 Cúrcuma.....	9
3.2 Efeitos protetores da curcumina na injúria de isquemia e reperfusão tecidual.....	12
4 Objetivos.....	15
4.1 Objetivo geral.....	15
4.2 Objetivos específicos.....	15
Referências.....	16
CAPÍTULO 2 – EFEITO DA CURCUMINA NAS CÉLULAS ENDOTELIAS SOB ESTRESSE OXIDATIVO	
Resumo.....	21
Abstract.....	22
1 Introdução.....	23
2 Materiais e métodos.....	24
3 Análise estatística.....	26
4 Resultados e discussão.....	27
5 Conclusão.....	32
Referências.....	32
CAPÍTULO 3 – CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO ETANÓLICO DO AÇAFRÃO (Curcuma longa L.) DE MARA ROSA-GO	
Resumo.....	35
Abstract.....	35
1 Introdução.....	36

2	Materiais e métodos.....	37
3	Resultados e discussão.....	38
4	Conclusão.....	43
	Referências.....	44

CAPÍTULO 4 – EFEITO PROTETOR DO EXTRATO ETANÓLICO DO AÇAFRÃO (CURCUMA LONGA L.) DE MARA ROSA-GO SOBRE AS CÉLULAS ENDOTELIAIS DE VEIA UMBILICAL HUMANA EM ESTRESSE OXIDATIVO

	Resumo.....	46
	Abstract.....	47
1	Introdução.....	48
2	Materiais e métodos.....	49
3	Análise estatística.....	52
4	Resultados e discussão.....	52
5	Conclusão.....	61
	Referências.....	61

	CAPÍTULO 5 – CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	62
--	--	----

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES INICIAIS

- Figura 1 – Representação esquemática do desenvolvimento da injúria celular a partir da isquemia. A privação de O₂ diminui a fosforilação oxidativa e conseqüentemente a produção de ATP. A diminuição da atividade da bomba de Na⁺/K⁺ acarreta aumento do influxo de Na⁺, Ca₂⁺ e H₂O, com efluxo de K⁺. o desequilíbrio iônico, juntamente com a queda do pH, provoca ativação de enzimas destrutivas. No entanto, essas alterações podem ser revertidas, se o fator desencadeante da isquemia não for suprimido, a injúria levará à morte celular.....3
- Figura 2 – Esquema das reações químicas geradas durante a isquemia e reperfusão tecidual. durante o período de isquemia, o ATP é catabolizado à hipoxantina. Com o retorno do oxigênio (O₂) ela é oxidada e uma produção maciça de espécies reativas de O₂ é formada5
- Figura 3 – Representação esquemática da ativação do complexo NAD(P)H oxidase. após o estímulo ativador, os componentes citosólicos p40phox, p47phox e p67phox migram para a membrana celular e junta-se ao citocromo b558 (p22phox e gp91phox). Esse complexo é capaz de liberar O₂⁻ (ânion superóxido), por meio de transferência de elétrons para a redução de O₂.....7
- Figura 4 – Produção de espécies reativas a partir do desacoplamento da enzima eNOS, devido ao estresse oxidativo. 8
- Figura 5 – Plantação de cúrcuma (*Curcuma longa* L.) em Mara Rosa-GO (A). Rizomas coletados e em processo de secagem (B). Rizomas transformados em pó (C).10
- Figura 6 – Representação da estrutura molecular dos pigmentos curcuminóides presentes no rizoma da *Curcuma longa* L.....10
- Figura 7 – Imagens das áreas de infarto encefálico de ratos submetidos a isquemia e reperfusão. as setas indicam a extensão das lesões (coloração de TTC - 2,3,5-cloreto de trifeniltetrazólio). Observa-se que a administração de curcumina promoveu uma diminuição das lesões encefálicas, comparadas aos grupos controle, tanto no trabalho 1 (esquerda) quanto no 2 (direita).14

CAPÍTULO 2 – EFEITO DA CURCUMINA NAS CÉLULAS ENDOTELIAS HUMANAS SOB ESTRESSE OXIDATIVO

- Figura 1 – Ensaio de viabilidade celular pela redução do sal de tetrazólio (MTT). Os valores foram obtidos a partir da absorbância registrada em espectrofotômetro, no comprimento de onda de 532nm. As letras minúsculas indicam a diferença estatística entre as concentrações e as maiúsculas entre os tempos de exposição (teste de t com p<0,05).....27

Figura 2 – Ensaio de viabilidade celular perante o estresse oxidativo, pelo método de redução do sal de tetrazólio. Análise das médias (em porcentagem) de viabilidade celular por concentração de curcumina em relação ao tempo de exposição (24h, 48h e 72h). As letras minúsculas indicam a diferença estatística entre as concentrações e as maiúsculas entre os tempos de exposição (teste de t com $p < 0,05$).....30

CAPÍTULO 3 – CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO ETANÓLICO DO AÇAFRÃO (Curcuma longa L.) DE MARA ROSA-GO

Figura 1 – Cromatograma da molécula de curcumina. a) Tempo de retenção e área da curcumina padrão. Os gráficos b, c e d demonstram os picos de curcumina encontrados nas amostra do extrato etanólico da Curcuma longa L. (EEC) proveniente de Mara Rosa/Goiás.....40

Figura 2 – Imagem representativa da curva de calibração, equação e coeficiente de determinação do padrão curcumina.....41

Figura 3 – Gráfico de dispersão entre a absorbância (nm) e a concentração do padrão Trolox ($\mu\text{mol Trolox/mL}$).....42

CAPÍTULO 4 – EFEITO PROTETOR DO EXTRATO ETANÓLICO DO AÇAFRÃO (CURCUMA LONGA L.) DE MARA ROSA-GO SOBRE AS CÉLULAS ENDOTELIAIS DE VEIA UMBILICAL HUMANA EM ESTRESSE OXIDATIVO

Figura 1 – Fotomicrografias de lâminas contendo células de endoteliais de veia umbilical humana, em ambiente de normoxia, após o ensaio de imunocitoquímica pelo processador automático Bond-Max (Leica). Notou-se que a intensidade de imunomarcção pelo anticorpo caspase3 foi menor nas células tratadas com o extrato etanólico da Curcuma longa L. Com o anticorpo SIRT1 e mTOR visualizou-se uma maior marcação nas células expostas. Coloração: DAB, contra-coloração com hematoxilina.....56

Figura 2 – Fotomicrografias de lâminas contendo células de endoteliais de veia umbilical humana, submetidas ao estresse oxidativo, após o ensaio de imunocitoquímica pelo processador automático Bond-Max (Leica). A reação de imunomarcção de caspase3 diminuiu acentuadamente nas células expostas ao extrato etanólico da Curcuma longa L em relação ao controle. O inverso foi observado com a utilização dos anticorpos SIRT1 e mTOR, em que a imunomarcção nos grupos controle foram menores em relação ao tratamento com o extrato. Coloração: DAB, contra- coloração com hematoxilina.57

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2 – EFEITO DA CURCUMINA NAS CÉLULAS ENDOTELIAS SOB ESTRESSE OXIDATIVO

- Tabela 1 – Valores de citotoxicidade da curcumina em células endoteliais de veia umbilical humana, em relação aos tempos de exposição 24h, 48h e 72h e concentração curcumina (μM).....28
- Tabela 2 – Valores de citotoxicidade da curcumina em células endoteliais de veia umbilical humana expostas ao H_2O_2 , em relação aos tempos de exposição 24h, 48h e 72h e concentração curcumina (μM).....31

CAPÍTULO 3 – CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO ETANÓLICO DO AÇAFRÃO (Curcuma longa L.) DE MARA ROSA-GO

- Tabela 1 – Resultados da pureza de curcumina presente no extrato etanólico do açafrão de Mara Rosa.....41
- Tabela 2 – Capacidade antioxidante em equivalente padrão Trolox ($\mu\text{mol Trolox/mL}$) do extrato etanólico do açafrão de Mara Rosa.....43

CAPÍTULO 4 – EFEITO PROTETOR DO EXTRATO ETANÓLICO DO AÇAFRÃO (CURCUMA LONGA L.) DE MARA ROSA-GO SOBRE AS CÉLULAS ENDOTELIAIS DE VEIA UMBILICAL HUMANA EM ESTRESSE OXIDATIVO

- Tabela 1 – Valores de viabilidade celular obtidos da absorvância por espectrofotometria para amostras de HUVEC em normoxia, após exposição contínua ao EEC por 24, 48 ou 72 horas.....53
- Tabela 2 – Valores de viabilidade celular obtidos a partir da absorvância por espectrofotometria de amostras de HUVEC em normoxia, com as diferentes concentrações de EEC.....53
- Tabela 3 – Citotoxicidade de células endoteliais de veia umbilical humana, em condição de normoxia. Os valores foram obtidos no ensaio de redução do sal de tetrazólio.....54
- Tabela 4 – Ensaio de viabilidade celular pelo método de redução do sal de tetrazólio, em células endoteliais, submetidas ao estresse oxidativo (H_2O_2 à 1%). Análise das médias de absorvância em relação à concentração de EEC utilizada e os tempos de exposição (24h, 48h e 72h).....55
- Tabela 5 – Valores de viabilidade celular obtidos com as diferentes concentrações de EEC, a partir da absorvância por espectrofotometria de amostras de HUVEC em estresse oxidativo.....54
- Tabela 6 – Citotoxicidade celular apresentada pelas células endoteliais de veia umbilical humana, submetidas ao estresse oxidativo (H_2O_2 à 1%) e tratadas previamente

com o extrato etanólico da <i>Curcuma longa</i> L. em diferentes concentrações e tempos de exposição.....	55
Tabela 7 – Escore de Allred para a avaliação das imunomarcações em células endoteliais de veia umbilical humana, em condições de normoxia.....	58
Tabela 8 – Escore de Allred para a avaliação das imunomarcações em células endoteliais de veia umbilical humana, em condições de estresse oxidativo.....	58

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Delineamento experimental da diluição das concentrações do EEC de cada grupo utilizado para o tratamento das células endoteliais, nos tempos de exposição de 24 h, 48 h e 72 h.....	50
Quadro 2 –Tonalidades de referência para estabelecimento dos escores atribuídas às diferentes expressões das proteínas pela análise da imunocitoquímica.....	52

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ADP	Adenosina difosfato
AMP	Monofosfato de adenosina
ATP	Adenosina trifosfato
ATPase	Adenosinatrifosfatase
AVE	Acidente vascular no encéfalo
Ca ⁺²	Cálcio
CUR	Curcumina
DAB	Cromógeno 3,3' diaminobenzidine tetrahydrochloride
DCNT	Doenças crônicas não transmissíveis
DNA	Ácido desoxirribonucleico
eNOS	Óxido nítrico-sintase endotelial
EEC	Extrato etanólico da Cúrcuma
EO	Estresse oxidativo
ERK1/2	Proteína quinase regulada por sinal extracelular
ERO	Espécies reativas do oxigênio
FTIR	Espectroscopia na região do infravermelho
H ⁺	Hidrogênio
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HUVEC	Células endoteliais de veia umbilical humana
I/R	Isquemia e reperfusão
ICAM-1	Molécula de adesão intercelular 1
IL-6	Interleucina-6
iNOS	Óxido nítrico-sintase induzível
JNK	Proteína quinase c-Jun N-terminal
K ⁺	Potássio
LDH	Lactato desidrogenase
LDL-ox	Lipoproteína de baixa densidade oxidada
MAPK	Proteína-quinase ativadas por mitógenos
MCP-1	Proteína quimiotática para monócito-1
MDA	Malonaldeído
MEC	Matriz extracelular
MMPs	Metaloproteinases de matriz
mTOR	Proteína alvo da rapamicina em mamíferos
Na ⁺	Sódio
NAD(P)H	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato de hidrogênio
NF-κB	Fator nuclear kappa B
nNOS	Óxido nítrico-sintase neuronal

NOS	Óxido nítrico sintase
NOX	NADPH oxidase
O ₂	Oxigênio
O ₂ ⁻	Superóxido
OCH ₃	Metoxila
OH	Fenol
OH ⁻	Radical hidroxila
ONOO	Peróxinitrito
OX	Xantina oxidase
pH	potencial Hidrogeniônico
SIRT1	Sirtuínas do tipo 1
SOD	Superóxido-dismutase
TGF-β1	Fator de crescimento transformador beta
TNF-α	Fatores de Necrose Tumoral Alfa
TPM	Poros de transição de permeabilidade mitocondrial
UCP2	Proteína desacopladora 2
VCAM-1	Molécula de adesão celular vascular-1

RESUMO

A injúria tecidual por isquemia é bastante nociva e, em situações de reperfusão, pode provocar a formação exacerbada de espécies reativas do oxigênio (ERO), que interferem diretamente na cascata de sinalização celular, com efeitos deletérios como a peroxidação lipídica da membrana celular, a oxidação de proteínas e a lesão ao DNA. As pesquisas têm mostrado os efeitos benéficos dos antioxidantes presentes nos vegetais e, entre eles encontra-se a curcumina, um pigmento antioxidante do rizoma da *Curcuma longa* L., conhecida como açafrão ou cúrcuma. Essa planta demonstra atividades farmacológicas, que são relatadas desde a antiguidade, como antioxidante, anti-inflamatório, antibacteriano, antifúngico, antitumoral, antiparasitário, antiviral, cicatrizante, hipoglicemiante, neuroprotetor e imunomodulador. Diante disso, objetivou-se com essa pesquisa avaliar a possível ação antioxidante da curcumina sobre as células endoteliais de veia umbilical humana (HUVEC), em cultivo, submetidas e não submetidas ao estresse oxidativo (EO). Este estudo foi dividido em três fases. Na primeira fase avaliou-se a ação da curcumina padrão (Sigma Aldrich, Referência C1386) em diferentes concentrações (0 μmol , 20 μmol , 50 μmol , 100 μmol e 1000 μmol) e por três tempos diferentes de exposição contínua (24 h, 48 h e 72 h). O ensaio de EO foi induzido por meio da exposição celular ao peróxido de hidrogênio a 1% e por meio do ensaio de redução do MTT (metil-tiazolil-tetrazólio), pôde-se avaliar a viabilidade celular e a citotoxicidade. Na segunda fase do estudo determinou-se a presença e o teor de compostos antioxidantes no extrato etanólico da *Curcuma longa* L. (EEC) proveniente de Mara Rosa-GO. As amostras do EEC foram submetidas aos testes de Folin-Ciocalteu, à captura do radical DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) e ao método de HPLC-Fluorescence. Na terceira fase da pesquisa avaliou-se o efeito do EEC em cultivos de HUVEC sob as mesmas condições experimentais da primeira fase, além disso, pesquisou-se as vias de sinalização tanto de sobrevivência, quanto de morte celular possivelmente ocorridas. Os resultados demonstraram que as células tratadas com 20 μmol de curcumina padrão e nos tempos de 24 h e 48 h apresentaram melhor viabilidade celular e conseqüentemente, menor citotoxicidade. A ocorrência do estresse oxidativo foi validada pelo decréscimo na viabilidade celular dentro das três variáveis de tempo utilizadas, com uma proteção antioxidativa na dosagem de 50 μmol de curcumina. No EEC pôde-se identificar o ácido gálico, a curcumina (16,7%) e a quantidade de 18,1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de extrato, para se reduzir em 50% o radical DPPH. Os resultados da terceira fase indicaram que o EEC possivelmente amenizou a injúria celular por estresse oxidativo, na dosagem de 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, por diminuição da imunexpressão de caspase3 e pelo aumento da sinalização da rota de sobrevivência SIRT1. Concluiu-se que tanto a curcumina pura, quanto o EEC pode aumentar a viabilidade celular de células endoteliais sob estresse oxidativo.

Palavras-chaves: ácido gálico, curcumina, DPPH, estresse oxidativo, HUVEC.

ABSTRACT

Ischemic tissue injury is quite harmful, however, reperfusion causes an exacerbated level of reactive oxygen species (ROS), which directly interfere in the cell signaling cascade, with cell deleterious effects such as lipid peroxidation, protein oxidation and DNA damage. Researches had shown the beneficial effects of antioxidants present in vegetables and among them is curcumin, an antioxidant pigment found in *Curcuma longa* L. rhizomes, known as turmeric or saffron. This plant has demonstrated pharmacological activities, which have been reported since antiquity, as antioxidant, anti-inflammatory, antibacterial, antifungal, antitumor, antiparasitic, antiviral, healing, hypoglycemic, neuroprotective and immunomodulatory. Therefore, the aim of this research was to evaluate the possible antioxidant action of curcumin on human umbilical vein endothelial cells (HUVEC), in culture, submitted and not submitted to oxidative stress (EO). This study was divided into three phases. In the first time, the action of standard curcumin (Sigma Aldrich, Reference C1386) was evaluated at different concentrations (0 μmol , 20 μmol , 50 μmol , 100 μmol and 1000 μmol) and for three different times of continuous exposure (24 h, 48 h and 72 h). The EO assay was induced through cellular exposure to 1% hydrogen peroxide and through the MTT (methyl-thiazolyl-tetrazolium) reduction assay, cell viability and cytotoxicity could be assessed. In the second phase, we determined the presence and content of antioxidant compounds in the ethanol extract of *Curcuma longa* L. (EEC) from Mara Rosa-GO. EEC samples were subjected to Folin-Ciocalteu tests, capture of the DPPH radical (2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazil) and the HPLC-Fluorescence method. In the third phase of this research, the effect of EEC in HUVEC cultures was evaluated under the same experimental conditions as the first phase, in addition with the possible signaling pathways of both survival and cell death. The results showed that the cells treated with 20 μmol of standard curcumin and at 24 h and 48 h showed better cell viability and, consequently, less cytotoxicity. The occurrence of oxidative stress was validated by the decrease in cell viability within the three times variables used, but an antioxidative protection was found at 50 μmol of curcumin. In EEC, we identified gallic acid, curcumin (16.7%) and the amount of 18.1 μg / mL of extract, to reduce the DPPH radical by 50%. Results from the third phase indicated that the EEC possibly alleviated cell damage by oxidative stress at the dosage of 100 μg / ml, by decreasing the immunoexpression of caspase3 and by increasing the signaling of the SIRT1 survival route. It was concluded that both pure curcumin and EEC can improve the cell viability of HUVEC under oxidative stress.

Keywords: gallic acid, curcumin, DPPH, oxidative stress, HUVEC.

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES INICIAIS

As doenças do sistema circulatório estão entre as principais causas de morbidade e mortalidade em humanos e, suas repercussões clínicas geram co-morbidades que elevam negativamente os indicadores de saúde populacional, além de dispendiosos gastos públicos. Neste contexto, a maioria dessas doenças ocorre pelo mecanismo de isquemia e reperfusão (I/R), uma condição em que o fluxo sanguíneo rico em oxigênio é restringido ou interrompido a determinado órgão ou tecido, seguido por seu restabelecimento. O infarto do miocárdio e o acidente vascular encefálico por anóxia são alguns dessa condição¹⁻³.

Dentre os mecanismos envolvidos na fisiopatologia da lesão tecidual secundária à I/R, o mais importante é a formação de espécies reativas do oxigênio (ERO). As ERO promovem oxidação de macromoléculas celulares como lipídeos, proteínas e ácidos nucléicos, entretanto a ocorrência de danos oxidativos no ácido desoxirribonucleico (DNA) ativa proteínas que culminam em morte celular por apoptose³.

O endotélio vascular é um tecido extremamente vulnerável à reperfusão e sua disfunção resulta em resposta microvascular alterada, produção de moléculas oxidantes, vasoconstritoras, pró-inflamatórias e pró-trombóticas. A presença do óxido nítrico (NO), um fator relaxante derivado de endotélio, é fundamental para a proteção da parede vascular, porém o excesso de ERO, conhecido por estresse oxidativo (EO), inibe diretamente sua síntese e prejudica seu efeito protetor. Sirtuínas do tipo 1 (SIRT1) são moléculas envolvidas na sobrevivência celular; sua atividade tem sido associada a reduções no estresse oxidativo, na inflamação e na sinalização pró-apoptótica, bem como no restabelecimento do DNA danificado. Ademais, SIRT1 também induzem a produção de NO por ativação da enzima óxido nítrico sintetase endotelial (eNOs), o que gera um sinergismo no combate ao EO^{4,5}.

Antioxidantes são substâncias endógenas ou exógenas, que protegem as células contra os efeitos das ERO, produzidas durante o metabolismo ou injúria celular. Os estudos têm demonstrado os efeitos benéficos da ação dos antioxidantes encontrados nos vegetais. Entre eles os mais ativos e frequentemente encontrados são os polifenóis, tais como os curcuminóides, presentes no rizoma da *Curcuma longa* L. Conhecida como açafrão ou cúrcuma, a planta é originária da Índia e do sudeste da Ásia. Seu principal curcuminóide é a curcumina, que tem sido alvo recorrente de pesquisas em razão de suas propriedades farmacológicas⁷⁻⁹.

No Brasil, a maior produção e consumo do açafrão encontra-se no Centro-Oeste e em Minas Gerais. A região produtora que mais se destaca é Mara Rosa, município de Goiás,

onde a cadeia produtiva gera emprego para a população local e os teores de curcumina dos rizomas são bastante significativos¹⁰⁻¹².

As pesquisas têm demonstrado que a curcumina apresenta atividade protetora tanto *in vivo* quanto *in vitro*. O uso dessa substância, pela via oral, anteriormente à I/R miocárdica amenizou tanto a porcentagem da área de infarto miocárdico, quanto o índice apoptótico, o que foi induzido, primariamente, pela ativação da molécula de sobrevivência, SIRT1. Perante o infarto encefálico experimental de ratos, os resultados também demonstraram uma porcentagem de área acometida, significativamente menor, no grupo que recebeu o tratamento com a curcumina. Além de diminuição nas expressões de citocinas pró-inflamatórias, enzimas de degradação da barreira hematoencefálica e de apoptose¹³⁻¹⁴.

A substituição do uso de animais de laboratório em pesquisas, por células em cultivo está bastante difundida e, nessa perspectiva, o uso de células endoteliais de veia umbilical humana (HUVEC), tem possibilitado a observação satisfatória de alterações morfológicas e bioquímicas oriundas de I/R¹⁵. Portanto, este estudo objetivou investigar e melhor compreender o efeito do extrato etanólico da *Curcuma longa* L. em células endoteliais (HUVEC) sob estresse oxidativo. Propõe-se avaliar a utilização do extrato como alternativa acessível e economicamente viável para a atenuação de doenças de origem circulatória.

1. INJÚRIA DE ISQUEMIA E REPERFUSÃO

1.1. Alterações celulares decorrentes da isquemia

Isquemia é uma condição em que o fluxo sanguíneo, rico em oxigênio, é restringido ou interrompido a determinado órgão ou tecido, prejudicando sua oxigenação celular. No decorrer de uma isquemia, o metabolismo celular aeróbico é suprimido, e ocorre somente o metabolismo anaeróbico. Conseqüentemente, as mitocôndrias, organelas responsáveis por converter o oxigênio (O₂) em energia para as células, sofrem alterações bioquímicas e morfológicas que podem resultar em morte celular³.

Em razão da anaerobiose celular, o meio entra em acidose e ativa proteases intracelulares como as caspases, que participam do processo de indução da morte celular. A restauração do acúmulo de H⁺ é realizado pelas membranas basolaterais das células, que possuem os canais trocadores Na⁺/H⁺. Entretanto, a excreção do excesso de H⁺ promove um elevado efluxo de Na⁺. Esse também se acumula por diminuição da atividade da bomba de

Na^+/K^+ . Como resultado destes processos, ocorre acúmulo de água no interior da célula, resultando em edema citotóxico ou degeneração hidrópica^{3,16,17}.

A fosforilação oxidativa que ocorre nas mitocôndrias também é afetada pela supressão do oxigênio e isso provoca diminuição da produção de adenosina trifosfato (ATP). Dessa forma, todas as funções celulares ficam comprometidas e o gradiente eletroquímico transmembrana é dissipado, promovendo um influxo de cálcio para dentro da célula e ativando fosfolipases, proteases e endonucleases, enzimas degradadoras de membranas e de componentes do citoesqueleto celular. O dano mitocondrial ocorre pela degradação de fosfolipídeos e por produtos da degradação lipídica. Essas mudanças são acompanhadas pela abertura do poro de transição de permeabilidade mitocondrial (TPM), que dissipa o potencial da membrana e prejudica ainda mais a fosforilação oxidativa. Ressalta-se que a célula acometida tem uma capacidade limitante de resposta adaptativa e, se o estímulo nocivo for interrompido, há possibilidades de a célula retornar à homeostasia. Todavia, se o limite for ultrapassado, haverá morte celular (Figura 1)¹⁷⁻¹⁸.

No organismo em homeostasia, a respiração celular aeróbica gera quantidades reduzidas de ERO e elas são necessárias para que ocorram processos fisiológicos nas células como sinalização e regulação intracelular, transcrição gênica e síntese protéica. Essa produção basal consegue ser neutralizada pelos sistemas antioxidantes enzimáticos endógenos, mas em condições patológicas tem-se desequilíbrio e injúria celular^{16,17}.

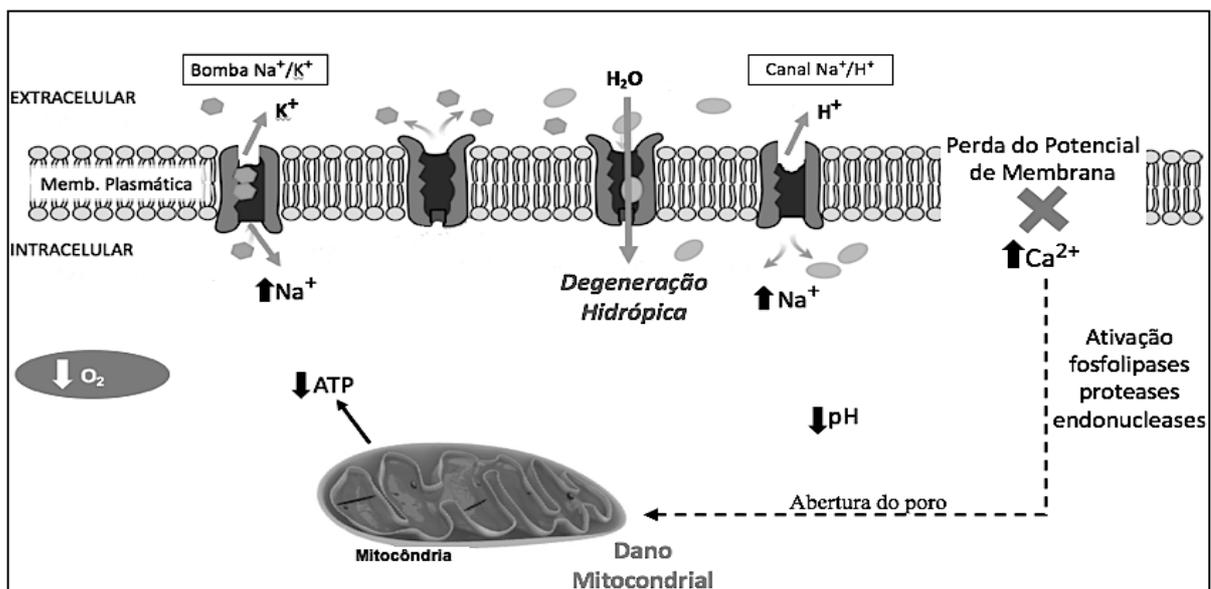


Figura 1 – Representação esquemática do desenvolvimento da injúria celular a partir da isquemia. A privação de O_2 diminui a fosforilação oxidativa e conseqüentemente a produção de ATP. A diminuição da atividade da bomba de Na^+/K^+ acarreta aumento do influxo de Na^+ , Ca^{2+} e H_2O , com efluxo de K^+ . O desequilíbrio iônico, juntamente com a queda do pH, provoca ativação de enzimas destrutivas. No entanto, essas alterações podem ser

revertidas. Se o fator desencadeante da isquemia não for suprimido, a injúria levará à morte celular.

Fonte: Adaptado de Cotran¹⁷.

1.2. Reperusão

A reperusão é o restabelecimento do fluxo sanguíneo às células que se encontravam em isquemia e trata-se de um processo fundamental, mas sabe-se que apesar disso, a reoxigenação piora a lesão isquêmica, principalmente devido a abertura permanente dos poros de TPM. Durante a isquemia, o meio intracelular ácido evita a fissura desses poros; entretanto, o retorno do O₂ promove a restauração do pH fisiológico, que estimula sua abertura permanente. Em consequência, rompe-se a membrana mitocondrial e componentes pró-apoptóticos como o fator indutor da apoptose e o citocromo-c são liberados no citoplasma, desencadeando o processo. Na isquemia cardíaca, por exemplo, o retorno do O₂ é imprescindível, porém uma característica fatal dessa reperusão é a apoptose dos cardiomiócitos¹⁷⁻²⁰.

O retorno de oxigênio molecular ao tecido envolve ainda sobrecarga de cálcio, permanência de abertura de poros TPM, disfunção endotelial, produção de citocinas, respostas inflamatórias e produção de ERO^{16,17,19}.

No período de isquemia, a síntese de ATP fica suspensa e esse começa a ser catabolizado gradativamente à ADP, AMP, adenosina, inosina e hipoxantina. O Ca²⁺ que se acumulou no citosol ativa uma protease citosólica conversora de xantina desidrogenase em xantina oxidase (OX). Dessa forma, a hipoxantina pode ser oxidada à xantina, pela OX, quando o O₂ é restabelecido. No decorrer dessas reações químicas são geradas as ERO como subprodutos, entre elas o ânion superóxido (O₂⁻), peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e radicais hidroxila (OH⁻) (Figura 3)²¹.

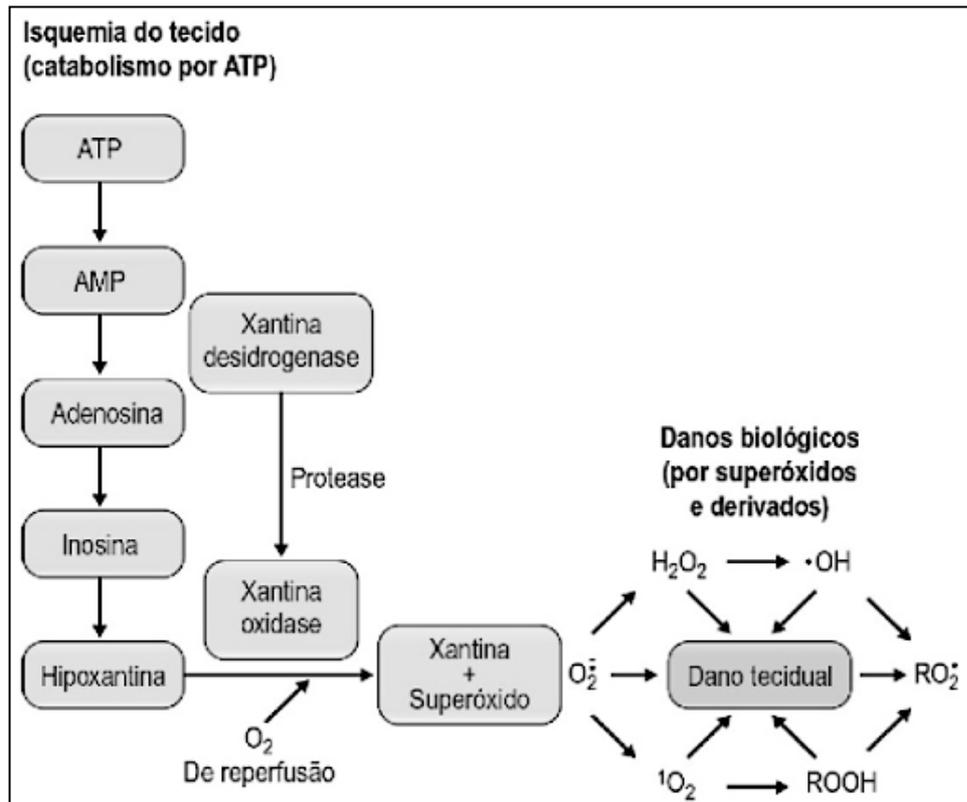


Figura 2 – Esquema das reações químicas geradas durante a isquemia e reperfusão tecidual. Durante o período de isquemia, o ATP é catabolizado à hipoxantina. Com o retorno do oxigênio (O_2) ela é oxidada e uma alta produção de espécies reativas de O_2 é formada. Fonte: Modificado de Silva J. et al.²¹.

O organismo apresenta sistemas enzimáticos endógenos para neutralização das ERO citadas anteriormente, sendo eles catalase, metionina-redutase, superóxido-dismutase (SOD) e sistemas tioredox e glutatona, no entanto, as pesquisas mostram que durante o período de reperfusão, a produção de ERO supera essa capacidade compensativa do sistema e o EO se estabelece²². Para comprovar isso, alguns pesquisadores utilizaram uma substância vasoconstritora para induzir EO em HUVEC e observaram além de alterações morfológicas, diminuição da viabilidade celular. Em outra pesquisa, ao se provocar reperfusão em cardiomiócitos, notou-se aumento de ERO por meio da biomarcação de moléculas características da peroxidação lipídica e do estresse oxidativo como a lactato desidrogenase (LDH) o malonaldeído (MDA) e a superóxido dismutase (SOD). Em tecido nervoso, o EO pós I/R foi demonstrado pelo aumento da expressão de p-ERK1/2 e p-JNK, que são vias intracelulares ativadas em resposta a esse tipo de injúria^{20,23,24}.

2. ESTRESSE OXIDATIVO

2.1. Sistemas produtores de espécies reativas no tecido endotelial

Com o avanço dos métodos de investigação nas pesquisas, pôde-se estabelecer que o tecido endotelial não atua somente como um tecido de revestimento de vasos sanguíneos e câmaras cardíacas; ele apresenta também funções endócrina, autócrina e parácrina. Em ambiente homeostático, o endotélio modula o tônus vasomotor, regula a estrutura vascular e inibe agregação plaquetária e adesão leucocitária. A manutenção dessas funções demanda oxigênio e nutrientes, o que torna o endotélio mais susceptível ao estresse oxidativo^{25,26}.

O desequilíbrio entre a produção e a eliminação de ERO afeta a síntese e o efeito protetivo do NO, molécula vasodilatadora derivada do endotélio. Uma restrição em sua biodisponibilidade acarreta em disfunção endotelial, termo que também inclui as anormalidades entre o endotélio e leucócitos, trombócitos e moléculas reguladoras do crescimento vascular^{27,28}.

A produção de ERO ocorre por meio de variados sistemas enzimáticos, incluindo respiração mitocondrial, óxido nítrico sintase (NOS), xantina oxidase, eNOS desacoplada e NAD(P)H oxidase (NOX), sendo esse último o principal produtor de ERO na vasculatura. Ele é formado por subunidades proteicas citosólicas (p40phox, p47phox, p67phox), com proteína G (Rac2) acoplada, e subunidades membranosas (p22phox, Nox2 ou gp91phox). Após um estímulo, p47phox é fosforilado e o complexo citosólico migra para a membrana, onde se associa ao citocromo b558 para montar a oxidase ativa (Figura 3), que é capaz de doar elétrons para a redução do oxigênio a O_2^- , de acordo com a equação: $2O_2 + NAD(P)H \rightarrow 2O_2^- + NAD(P) + H^+$ ^{29,30}.

O complexo enzimático NOX apresenta sete isoformas e quatro delas são expressas na vasculatura: Nox1, Nox2, Nox4, Nox5. Estudos demonstraram que em condições de aterosclerose, remodelamento vascular, aneurisma e vasculopatias, a maior parte das ERO são provenientes de Nox1 e Nox2. Entretanto a atividade de Nox4 já foi discutida de formas distintas e antagonicas. Alguns pesquisadores verificaram que sua expressão era maior em tecidos aórticos, provenientes de animais submetidos à dieta com alto teor de sódio. Com o uso de camundongos deletados para o gene que codifica Nox4, percebeu-se um efeito neuroprotetor relacionado à queda na formação de ERO. Por outro lado, Wang e colaboradores demonstraram que células endoteliais cardíacas, bloqueadas para os receptores

de Nox4, ao serem submetidas a I/R apresentaram aumento da apoptose e pior taxa de sobrevivência celular e angiogênese, subentendendo-se que Nox4 ameniza a injúria de I/R³¹⁻³³.

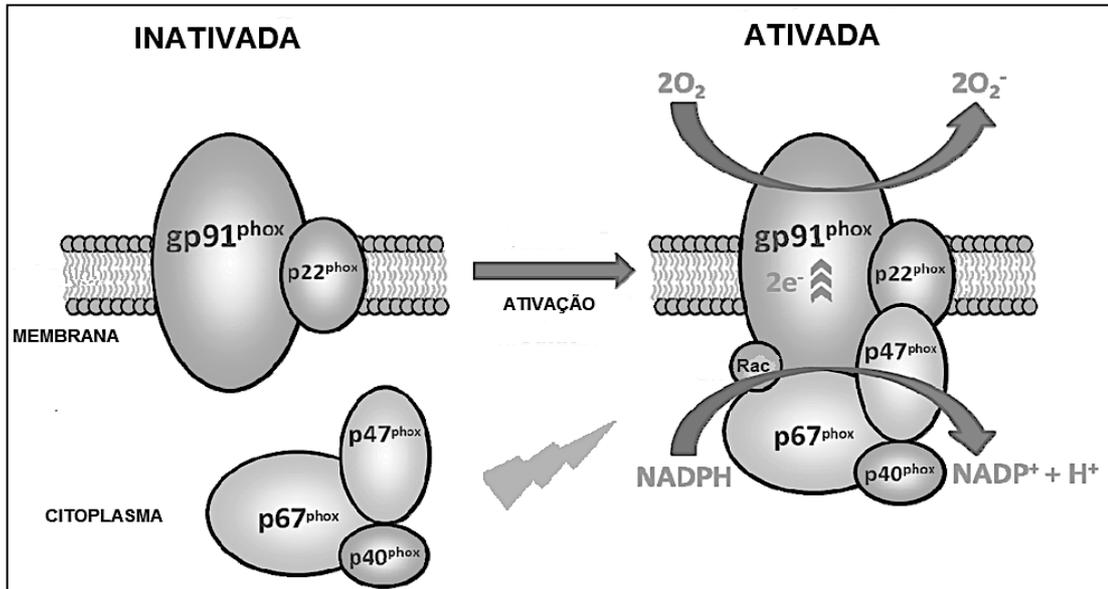


Figura 3 – Representação esquemática da ativação do complexo NAD(P)H oxidase. Após o estímulo ativador, os componentes citosólicos p40phox, p47phox e p67phox migram para a membrana celular e junta-se ao citocromo b558 (p22phox e gp91phox). Esse complexo é capaz de liberar O_2^- (ânion superóxido), por meio de transferência de elétrons para a redução de O_2 .
Fonte: Modificado de McCann e Roulston³⁰.

Outra fonte relevante de ERO na vasculatura é a eNOS desacoplada. O NO é produzido a partir da L-arginina, pela ação da óxido nítrico sintase (NOS) e a isoforma eNOS é a mais presente na vasculatura. A produção de NO envolve entre alguns cofatores, a tetraidrobiopterina (Bh4), entretanto na presença de espécies reativas como O_2^- , ou peróxido de nitrito ($ONOO^-$), ocorre sua oxidação à 7,8-diidrobiopterina, o que desacopla a eNOS e consequentemente produz O_2^- e não NO (Figura 4)^{34,35}.

No cérebro são encontradas três isoformas de NOS, a óxido nítrico sintase endotelial (eNOS), a óxido nítrico sintase neuronal (nNOS) e a óxido nítrico-sintase induzida (iNOS). Elas são responsáveis principalmente pelo controle do fluxo sanguíneo encefálico, porém estudos desmonstraram que após o acidente vascular no encéfalo (AVE), o NO produzido apresentava função tanto protetora quanto deletéria. No período isquêmico do AVE, a ação nociva derivou de nNOS e iNOS, cuja produção de NO reagiu com O_2^- dando origem ao $ONOO^-$, molécula deletéria de lipídeos e proteínas cerebrais³⁶.

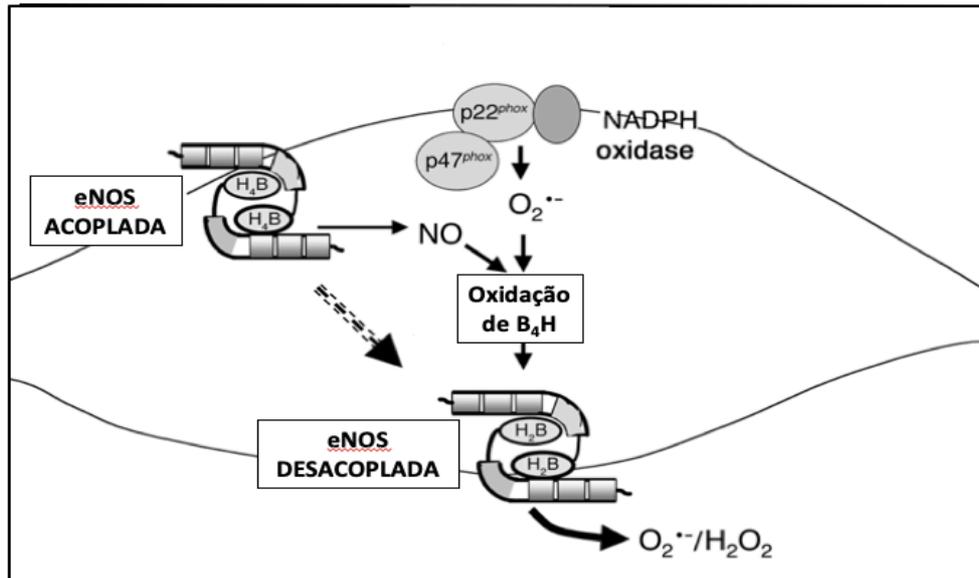


Figura 4 – Produção de espécies reativas a partir do desacoplamento da enzima eNOS, devido ao estresse oxidativo.

Fonte: Modificado de Landmesser et al³⁵.

2.2. Inflamação e remodelamento vascular

Sob condições oxidativas o endotélio desenvolve resposta inflamatória, tem-se um aumento na expressão de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α e interleucina-6 (IL-6), moléculas de adesão celular vascular-1 (VCAM-1), de adesão intercelular 1 (ICAM-1) e fator nuclear kappa B (NF- κ B)³⁷.

As pesquisas mostram que a inflamação vascular está diretamente relacionada com formação de placa de ateroma. Yingchun e colaboradores demonstraram que tanto a expressão de VCAM1 e ICAM1, quanto a infiltração leucocitária estavam presentes em tecidos aórticos de ratos induzidos à hipertrigliceridemia. Em outro estudo, foram detectados altos níveis de mRNA de IL-6, MCP-1, VCAM-1, ICAM-1 em cultivos de HUVEC submetidas ao EO, por lipoproteína de baixa densidade oxidada (LDL-ox). No tecido nervoso tem-se neutrófilos, microgliócitos e astrócitos como maiores ativadores de citocinas pró-inflamatórias. Essa ativação degrada os componentes da barreira hematoencefálica como as células endoteliais, os astrócitos e os neurônios. Por outro lado, a matriz extracelular (MEC) tem suas proteínas degradadas pela ação das metaloproteinases de matriz (MMPs)^{38,28,39}.

As MMPs são enzimas proteolíticas zinco-dependentes decompositoras de componentes da MEC e proteínas do tecido conjuntivo. Elas promovem remodelamento vascular e estão presentes em células endoteliais, fibroblastos, musculatura vascular lisa e células inflamatórias. As MMP são classificadas de acordo com o substrato celular em que

atuam, no entanto são sintetizadas na forma inativa, em razão de suas características destrutivas. Normalmente, as MMPs são expressas em pequenas quantidades, suficientes para atuarem em situações fisiológicas como proliferação celular, adesão, migração, quimiotaxia e sinalização, no entanto perante EO elas podem ser ativadas de forma direta ou indireta^{40,41}.

Estudos indicam que a remodelação após o infarto do miocárdio está associada ao EO e à diminuição das defesas antioxidantes. Ocorre hipertrofia dos cardiomiócitos, apoptose, proliferação de fibroblastos e alterações na produção e degradação de proteínas da matriz extracelular, principalmente pela via de sinalização da MAPK-Ras/MEK/ERK⁴².

Muito se tem relatado no meio científico e divulgado para a população em geral sobre os efeitos benéficos dos antioxidantes da dieta, na prevenção da formação de ERO e também na reparação de seus efeitos deletérios nas células. Nesse contexto, a curcumina tem ganhado espaço, devido à sua estrutura molecular funcional, capaz de provocar reações químicas biologicamente importantes como a doação de prótons hidrogênio, exercendo atividade antioxidante⁴³.

3. CURCUMINA

3.1. Cúrcuma

A cúrcuma (*Curcuma longa* L.) é uma planta que pertence à família das Zingiberaceae, gênero *Curcuma* L. Ela é proveniente da Índia e do sudeste da Ásia, mas está presente em zonas tropicais e subtropicais. No Brasil sua produção e consumo ocorrem mais no Centro-Oeste e em Minas Gerais, com nomenclatura popular de açafrão, açafroa, cúrcuma, turmérico, açafrão-da-terra, açafrão-da-índia ou falso-açafrão. O rizoma é a parte mais utilizada da planta devido a presença de pigmentos curcuminóides de coloração amarela intensa, que atua como corante e também especiaria (Figura 5)⁸⁻¹⁰.

O estado de Goiás, destaca-se na produção do açafrão devido à presença da Cooperativa dos Produtores de Açafrão de Mara Rosa, que reúne os municípios de Mara Rosa, Amaralina, Formoso e Estrela do Norte. Juntos, estes municípios produzem aproximadamente 800 a mil toneladas do produto por ano, o que confere mais de R\$ 1 milhão na economia do país. As características ambientais de Goiás favoreceram o cultivo do açafrão e propiciaram à planta o acúmulo de um elevado teor da curcumina podendo ser equiparado aos originários da Índia⁴⁴⁻⁴⁷.



Figura 5 – Plantação de cúrcuma (*Curcuma longa* L.) em Mara Rosa-GO (A). Rizomas coletados e em processo de secagem (B). Rizomas transformados em pó (C).

Além da curcumina, outros dois pigmentos curcuminóides (desmetoxicurcumina e bisdemetoxicurcumina) são encontrados no rizoma do açafrão, porém em menores quantidades (Figura 6). A diferença entre eles se dá pela presença do radical metoxila (OCH_3) na estrutura química. O anel benzênico ligado a um ou mais grupamentos hidroxilas ($-\text{OH}$) caracteriza a capacidade antioxidante da curcumina e essa propriedade tem sido alvo de pesquisas na linha de prevenção ou atenuação de doenças crônicas não transmissíveis (DCNT) causadora de estresse oxidativo, como o AVE, aterosclerose, diabetes, doenças cardiovasculares e hipertensão⁴⁸.

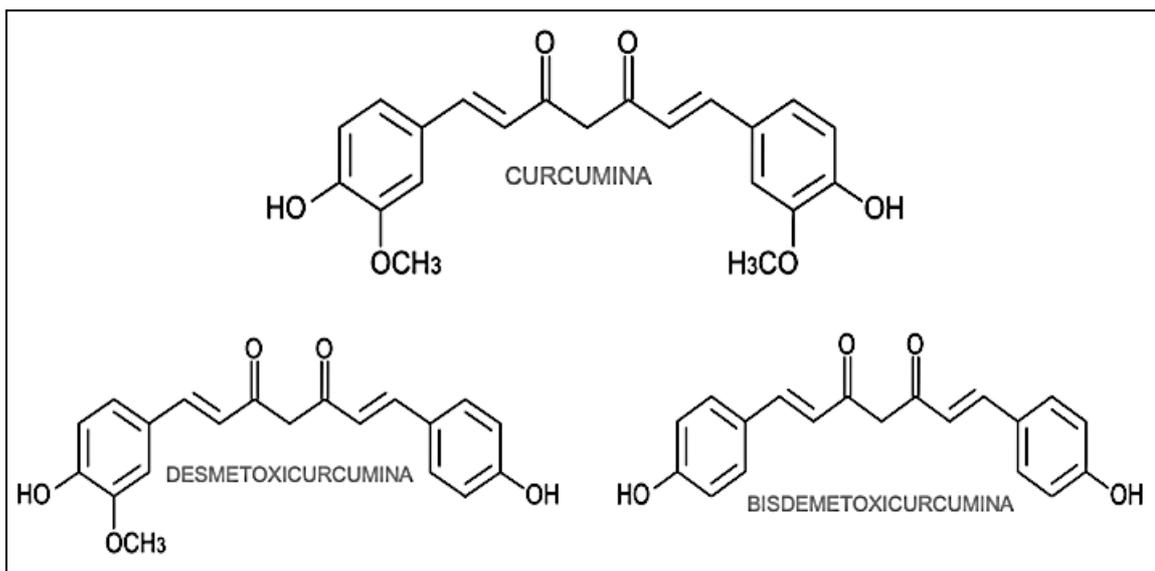


Figura 6 – Representação da estrutura molecular dos pigmentos curcuminóides presentes no rizoma da *Curcuma longa* L.
Fonte: Banik et al.⁹

Os aspectos físico-químicos de uma substância podem influenciar nas ações terapêuticas esperadas. Sabe-se que a curcumina apresenta baixa solubilidade e rápidas metabolização e eliminação, por conseguinte, a biodisponibilidade torna-se baixa. A natureza lipofílica da molécula é um dos principais fatores limitantes de seu uso. Carvalho e colaboradores demonstraram que a curcumina foi 6653 vezes mais solúvel em etanol do que em água, pois a hidrofobia, característica da molécula, induz a flutuação do pó na superfície aquosa, o que diminui a área de contato com o solvente. A dissolução da curcumina em diluições hidroetanólicas promove interações químicas favoráveis, em razão do caráter dipolar da molécula do etanol, que atua como dispersante e aumenta a solubilidade da curcumina, quando comparado com o uso de água pura⁴⁹.

Em relação ao metabolismo da curcumina, no trato gastrointestinal ela é conjugada à curcumina-glucuronida e sulfato de curcumina. Quando administradas por via intraperitoneal ou intravenosa ocorre a redução metabólica à di-hidrocurcumina, hexa-hidrocurcumina e octahidrocurcumina, entre outros. Alguns desses metabólitos também são descritos com propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes, porém independente da via de administração, a concentração plasmática da forma livre da molécula é muito baixa e a curcumina é mais ativa do que os seus metabólitos, portanto, a bioeficácia é condicionada à fração livre. Em razão disso, as pesquisas têm buscado adjuvantes ou estratégias que possam ser incorporados ao composto, para proporcionarem maior biodisponibilidade. Alguns exemplos incluem o uso de nanotecnologia, lipossomas, micelas ou complexos fosfolipídicos e associação à piperina^{50,51}.

Alguns estudos descreveram a eficácia desses métodos em comparação ao uso da curcumina pura. A proteção antioxidativa de nanocurcumina (10 nm) foi significativamente maior, perante os danos causados pelo organofosforado diazinon, pois as enzimas marcadoras de estresse oxidativo foram menores nos tecidos hepático, cardíaco e renal de ratos. O uso em conjunto de piperina e curcumina exibiu maior proteção contra cardiotoxicidade induzida em ratos. Essa comprovação foi vista pela melhora no padrão eletrocardiográfico, em que as enzimas de dano miocárdico se apresentaram em menor concentração e as enzimas antioxidantes em uma maior quantidade, quando comparadas ao grupo tratado apenas com curcumina^{51,52}.

3.2. Efeitos protetores da curcumina na injúria de isquemia e reperfusão tecidual

O Ministério da Saúde e a Associação Americana de Cardiologia tem divulgado índices cada vez maiores de mortalidade por doenças crônicas de caráter não transmissível, entre elas, as do sistema circulatório. Os acometimentos cardíacos permanecem como primeira causa de mortalidade em todo o mundo, seguidos dos acidentes vasculares encefálicos e das doenças metabólicas^{1,53}.

Cientistas chineses investigaram a atividade protetora da curcumina perante a injúria de I/R miocárdica, tanto *in vivo* quanto *in vitro*, e relataram efeito cardioprotetor. O composto amenizou os efeitos deletérios da alteração circulatória, a qual foi confirmada por meio do registro de áreas de infarto significativamente menores, além de menor índice apoptótico. A proteína inibidora de apoptose, Bcl-2, apresentou maior expressão nos tecidos, ao contrário da proteína Bax, pró-apoptótica, que se manteve em concentração reduzida. A função mitocondrial foi preservada, principalmente pela manutenção do potencial redox com a ativação da enzima SOD e diminuição de formações de H₂O₂ e MDA. Acredita-se que esses fatores derivaram primariamente da ativação de SIRT1, a qual conservou a homeostase mitocondrial por ativação dos fatores de transcrição envolvidos na biogênese das mitocôndrias¹³.

Em semelhante pesquisa, a suplementação oral de curcumina promoveu efeito cardioprotetor em animais submetidos à oclusão da artéria coronariana. As funções sistólica e diastólica pós-isquêmicas foram preservadas; pôde-se ver redução na área de infarto; níveis de MDA diminuíram e as enzimas antioxidantes (SOD, catalase, glutathione redutase, glutarredoxina) aumentaram, conforme a incrementação da concentração de curcumina. Isso corroborou com a queda de enzimas indicadoras de dano miocárdico LDH, CK-MB e aumento de Ca²⁺-ATPase e Na⁺-K⁺-ATPase. A redução da morte de cardiomiócitos foi diretamente proporcional à expressão de Bax e caspase3. De fato, a curcumina conferiu proteção cardíaca contra estresse oxidativo, apoptose e inflamação⁵⁴.

A fibrose miocárdica após a ocorrência de infarto pode ser causa de hospitalização e morte de pacientes acometidos. Sabe-se que a Angio II está envolvida nessa remodelação e, nesse sentido, testou-se o êxito da curcumina contra a expressão de colágeno I, colágeno III, TGF-β1, MMP-2 e MMP-9. Como resultado, foi observado que o pré-tratamento com curcumina reduziu a fibrose intersticial e também a área de infarto. Concomitantemente, comprovou-se que a ação da molécula se deu pela via SIRT1⁵⁵.

O AVE de origem isquêmica é a segunda causa mais comum de mortalidade e a principal causa de incapacidade entre a população adulta acometida. Restaurar a circulação sanguínea para a área isquêmica do cérebro é atualmente a única terapia aprovada pela *Food and Drug Administration* nos Estados Unidos. No entanto, essa reperfusão estimula células inflamatórias e agentes relacionados a apoptose, que alastram a lesão encefálica inicial. Por conseguinte, a obtenção de compostos que possam amenizar a ação dessas células inflamatórias pode ser benéfica e dessa forma, a curcumina apresenta propriedades que justificam o seu estudo^{56,57}.

Em outro estudo, Li e colaboradores ocluíram, experimentalmente, a porção inicial da artéria cerebral média de ratos, por uma hora e os trataram com curcumina intraperitoneal pré-reperfusão; os dados mostraram uma diminuição na expressão de citocinas pró inflamatórias ICAM-1 e NF- κ B, redução na marcação de metaloproteinase MMP-9 (enzima envolvida na degradação da barreira hematoencefálica) e redução de caspase. A porcentagem da área encefálica infartada, foi significativamente menor, quando comparado ao grupo controle. Esses resultados corroboraram-se com outra pesquisa, em que também se induziu I/R encefálica em ratos, porém da porção distal da artéria cerebral média. Foram encontradas reduções significativas tanto nas áreas de infarto, quanto na expressão de moléculas da inflamação, como pode ser visualizado na Figura 7. Assim, a curcumina comprovou ser efetiva na atenuação da injúria de I/R em AVE^{57,58}.

A curcumina também foi capaz de amenizar os efeitos do AVE em animais hipertensos e propensos a esse, por meio do estímulo da UCP2, proteína desacopladora de substratos da membrana interna mitocondrial. A melhora da disfunção endotelial se deu em virtude da supressão da produção de O_2^- e à elevação de NO nos vasos sanguíneos e nas células endoteliais⁵⁹.

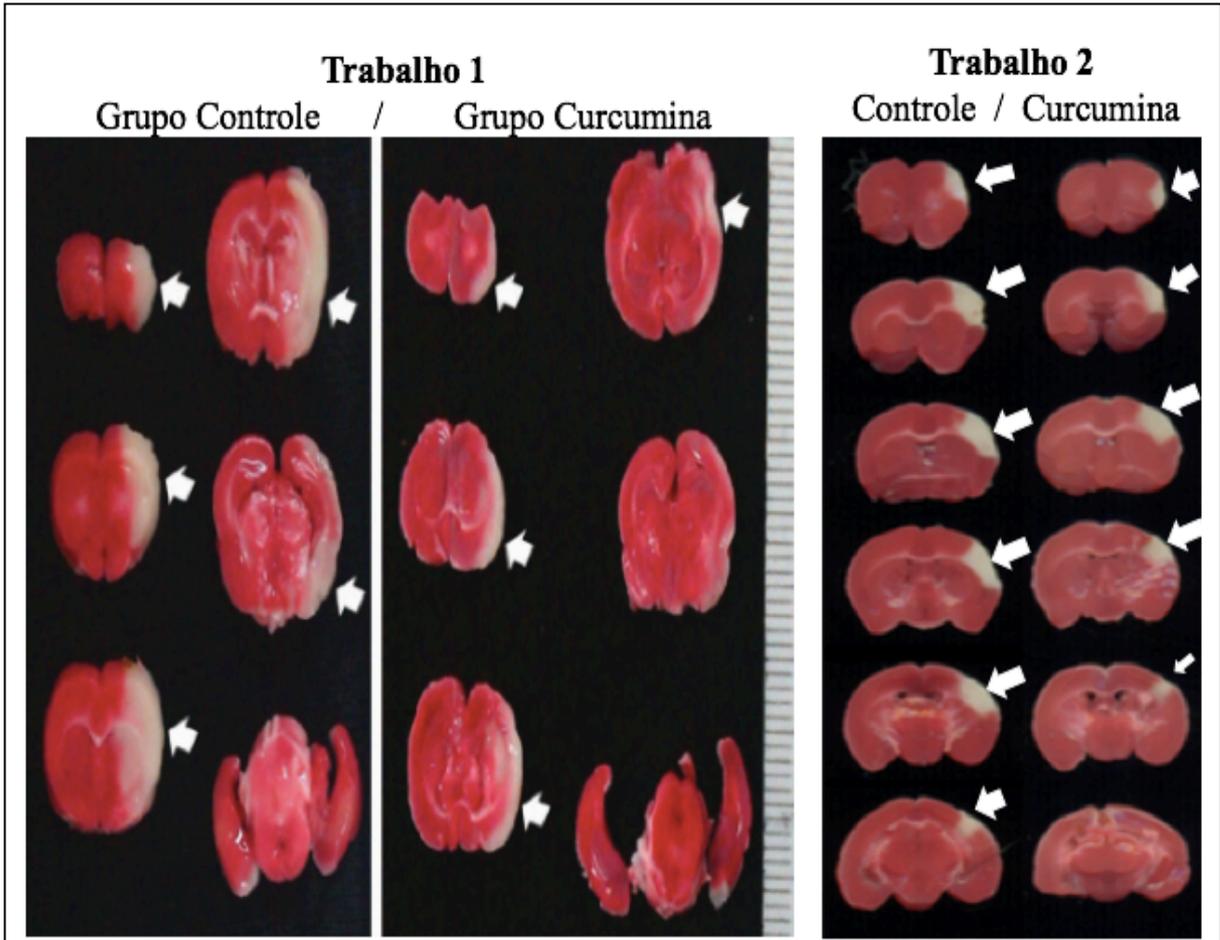


Figura 7 – Imagens das áreas de infarto encefálico em ratos submetidos a isquemia e reperfusão. As setas indicam a extensão das lesões. A administração de curcumina promoveu uma diminuição na extensão das lesões encefálicas, comparadas aos grupos controle, tanto no trabalho 1, quanto no 2.

Fonte: Adaptado de Li W, 2017⁵⁷; Liu Z, 2017⁵⁸.

Diante dos resultados promissores dessas pesquisas observou-se a necessidade de analisar os efeitos do uso prolongado de cúrcuma, principalmente com relação ao seu efeito protetor. Até o momento, nenhum outro estudo tinha investigado os efeitos do tratamento de células endoteliais de veia umbilical humana, com o extrato etanólico da *Curcuma longa* L., adquirida em Mara Rosa-GO. A hipótese deste trabalho é que o uso do extrato melhore a viabilidade das células em estresse oxidativo, promova a expressão de proteínas de sobrevivência celular, reduza a morte celular e possa representar uma alternativa economicamente viável de agente preventivo das injúrias provocadas pelo estresse oxidativo.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo geral

Investigar a ação da curcumina padrão, adquirida comercialmente (Sigma Aldrich Referência C1386) e do extrato etanólico da *Curcuma Longa* L. (EEC) proveniente da região de Mara Rosa, sobre as células endoteliais de veia umbilical humana (HUVEC), submetidas ao estresse oxidativo por peróxido de hidrogênio.

4.2. Objetivos específicos

- Determinar o teor de curcumina no EEC, por meio de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE/HPLC);
- Avaliar a ação antioxidante da curcumina padrão e do EEC nas HUVEC, em condições de normoxia e de estresse oxidativo;
- Estimar a citotoxicidade da curcumina padrão e do EEC nas HUVEC, em condições de normoxia e de estresse oxidativo;
- Verificar a ativação das vias de sinalização de sobrevivência:
 - SIRT1 e mTOR
- Analisar a marcação de apoptose:
 - Caspase3

REFERÊNCIAS

1. BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância de Doenças e Agravos não Transmissíveis e Promoção da Saúde. Saúde Brasil 2018 uma análise de situação de saúde e das doenças e agravos crônicos: desafios e perspectivas. 1ª ed. Brasília: Editora MS, 2019.
2. Soares GP, Klein CH, Silva NAS, Oliveira GMM. Evolução da Mortalidade por Doenças do Aparelho Circulatorio nos Municípios do Estado do Rio de Janeiro, de 1979 a 2010. Arquivos Brasileiros de Cardiologia [Internet]. 2015; 104:[356–65 pp.].
3. Kalogeris T, Baines CP, Krenz M, Korthuis RJ. Ischemia/Reperfusion. Comprehensive Physiology. 2016;7:113–70.
4. Donato AJ, Machin DR, Lesniewski LA. Mechanisms of Dysfunction in the Aging Vasculature and Role in Age-Related Disease. Circulation Research. 2018;123:825–848.
5. Rahman S, Islam R. Mammalian Sirt1: insights on its biological functions. Cell Commun Signal. 2011;9:11. DOI: 10.1186/1478-811X-9-11.
6. Piccinato CE. Perspectivas na terapia da isquemia e reperfusão. J Vasc Bras. 2014 Jul.-Set.; 13(3):159-161.
7. Marchi JP, Tedesco L, Melo AC, Frasson AC, França VF, Sato SW, Lovato ECW. *Curcuma longa* L., o açafrão da terra, e seus benefícios medicinais. Arq. Cienc. Saúde UNIPAR, Umuarama. 2016;20(3):189-194.
8. Prabhakaran Nair KP. The Agronomy and Economy of Turmeric and Ginger: the Invaluable Medicinal Spice Crops. London:Elsevier 2013:17-20p
9. Banik U, Parasuraman S, Adhikary AK, Orthman NH. Curcumin: the spicy modulator of breast carcinogenesis. Jour Exp Clin Cancer Res. 2017;36(1):98.
10. Marchi JP, Tedesco L, Melo AC, Frasson AC, França VF, Sato SW, Lovato ECW. *Curcuma longa* L., o açafrão da terra, e seus benefícios medicinais. Arq. Cienc. Saúde UNIPAR, Umuarama. 2016;20(3):189-194.
11. Andrade JWS. Produção e análise do açafrão em função do tamanho do rizoma no plantio. Horticultura Brasileira. 2005;23.
12. Péret-Almeida L, Naghetini CC, Nunan EA, Junqueira RG, Glória MBA. Atividade antimicrobiana *in vitro* do rizoma em pó, dos pigmentos curcuminóides e dos óleos essenciais da *Curcuma longa* L. Ciênc agrotec. 2008;32(3):875-81.
13. Yang Y, Duan W, Lin Y, Yi W, Liang Z, Yan J, Wang N, Deng C, Zhang S, Li Y, Chen W, Yu S, Yi D, Jin Z. Sirt1 activation by curcumin pretreatment attenuates mitochondrial oxidative damage induced by myocardial ischemia reperfusion injury. Free Radic. Biol. Med. 2013;65:667–79. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2013.07.007>

14. Li W, Suwanwela NC, Patumraj S. Curcumin prevents reperfusion injury following ischemic stroke in rats via inhibition of NF- κ B, ICAM-1, MMP-9 and caspase3 expression. *Molecular Medicine Reports*. 2017;16:4710-20. DOI: 10.3892/mmr.2017.7205
15. Catarino CM. Desenvolvimento de epiderme equivalente sobre membrana do tipo transwell e membrana biopolimérica [Tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo. Faculdade de Ciências Farmacêuticas; 2015. [acesso 30 mai 2019]. Disponível em: www.teses.usp.br/teses/disponiveis/9/.../Carolina_Mother_Catarino_ME_corrigida.pdf
16. Durão Júnior MS, Santos AFR, Boim MA, Santos OFP. Revisão/Atualização em Insuficiência Renal Aguda: Fatores de crescimento e canais iônicos: Há uma nova perspectiva na IRA? *J. Bras. Nefrol*. 1996;18(3):289-94.
17. Cotran RS, Kumar V, Collins T. Robins: Patologia estrutural e funcional. 6.ed. Rio de Janeiro: Guanabara; 2000. 1251.
18. Parolin MB, Reason IJM. Apoptose como mecanismo de lesão nas doenças hepatobiliares. *Arq. Gastroenterol*. [Internet]. 2001 Apr [cited 2017 Sep 27]; 38(2):138-144.
19. Hausenloy DJ, Yellon DM. Myocardial ischemia-reperfusion injury: a neglected therapeutic target. *J Clin Invest*.2013;23(1):92-100. DOI: 10.1172/JCI62874
20. Peng Zhu, Manli Yan, Hao He, Zhibin Kuang, Mu Liang, Anxiao Lin, Song Liang, Qiyun Wen, Zhiqin Cheng, Chaofeng Sun. Curcumin attenuates hypoxia/reoxygenation-induced cardiomyocyte injury by downregulating notch signaling. *Molecular Medicine Reports*. 2019;20: 1541-1550.
21. Silva Jr OC, Centurion S, Pacheco EG, Brisotti JL, Oliveira AF, Sasso KD. Aspectos básicos da lesão de isquemia e reperfusão e do pré-condicionamento isquêmico. *Acta Cirurgica Brasileira*. 2002;17(3):15-19.
22. Gholampour F, Sadidi Z. Hepatorenal protection during renal ischemia by quercetin and remote ischemic preconditioning. *Journal of Surgical Research*. v. 231, p. 224-233, 2018 <https://doi.org/10.1016/j.jss.2018.05.036>
23. Fang, L., Ren, D., Wang, Z., Liu, C., Wang, J., & Min, W. (2018). Protective role of hazelnut peptides on oxidative stress injury in human umbilical vein endothelial cells. *Journal of Food Biochemistry*, e12722. doi:10.1111/jfbc.12722
24. Miguel MP, Menezes LB, Araújo EA. Fisiopatologia do estresse oxidativo após isquemia e reperfusão cerebral e potencial neuroproteção do pequi (*Caryocar brasiliense*). *Enciclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer*. 2012;8(15):1960-76.
25. Barbato JE, Tzeng E. Nitric oxide and arterial disease. *J Vasc Surg*. 2004;40:187–193. PMID:15218485. <https://doi.org/10.1016/j.jvs.2004.03.043>
26. Verma S, Buchanan MR, Anderson TJ. Endothelial function testing as a biomarker of vascular disease. *Circulation*. 2003;108(17):2054–9.

27. Konukoglu D, Uzun H. Endothelial Dysfunction and Hypertension. *Hypertension: From Basic Research to Clinical Practice*. 2016;1:511–540. Springer, Cham doi:10.1007/5584_2016_90 (livro)
28. Gong L, Lei Y, Liu Y, Tan F, Li S, Wang X, Xu M, Cai W, Du B, Xu F, Zhou Y, Han H, Sun H, Qiu L. Vaccarin prevents ox-LDL-induced HUVEC EndMT, inflammation and apoptosis by suppressing ROS/p38 MAPK signaling. *Am J Transl Res*. 2019;11(4):2140–2154.
29. Altenhöfer S, Kleikers PW, Radermacher KA, Scheurer P, Rob Hermans JJ, Schiffers P, et al. The NOX toolbox: validating the role of NADPH oxidases in physiology and disease. *Cell Mol Life Sci*. 2012;69(14):2327–43.
30. McCann SK, Roulston CL. NADPH Oxidase as a Therapeutic Target for Neuroprotection against Ischaemic Stroke: Future Perspectives. *Brain Sciences*. 2013;3(2):561–98.
31. Touyz RM, Anagnostopoulou A, Camargo LL, Rios FJ, Montezano AC. Vascular Biology of Superoxide-Generating NADPH Oxidase 5—Implications in Hypertension and Cardiovascular Disease. *Antioxid Redox Signal*. 2019. 1;30(7):1027–1040. doi: 10.1089/ars.2018.7583
32. Kleinschnitz C, Grund H, Wingler K, Armitage ME, Jones E, Mittal M, Barit D, Schwarz T, Geis C, Kraft P, Barthel K, Schuhmann MK, Herrmann AM, Meuth SG, Stoll G, Meurer S, Schrewe A, Becker L, Gailus-Durner V, Fuchs H, Klopstock T, de Angelis MH, Jandeleit-Dahm K, Shah AM, Weissmann N, Schmidt HHHW, McLeod M. Post-stroke inhibition of induced NADPH oxidase type 4 prevents oxidative stress and neurodegeneration. *PLoS Biol* 2010;8:e1000479.
33. Wang J, Hong Z, Zeng C, Yu Q, Wang H. NADPH oxidase 4 promotes cardiac microvascular angiogenesis after hypoxia/reoxygenation in vitro. *Free Radic Biol Med*. 2014;69:278–88. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2014.01.027
34. Zhao Y, Vanhoutte PM, Leung, SWS. “Vascular nitric oxide: Beyond eNOS. *Journal of Pharmacological Science*. 2015;129(2):83–94.
35. Landmesser U, Mitch WE, Harrison DG. Oxidation of tetrahydrobiopterin leads to uncoupling of endothelial cell nitric oxide synthase in hypertension. *J Clin Invest*. 2003;111(8):1201-1209. DOI: 10.1172/JCI14172.
36. Nanetti LR, Taffi R, Vignini A. Reactive oxygen species plasmatic levels in ischemic stroke. *Mol. Cell. Biochem*. 2007; 303:19-35.
37. Prabhakar O. Cerebroprotective effect of resveratrol through antioxidant and anti-inflammatory effects in diabetic rats. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*. 2013;386(8):705–710. doi: 10.1007/s00210-013-0871-2.
38. Yingchun H, Yahong M, Jiangping W, Xiaokui H, Xiaohong Z. Increased inflammation, endoplasmic reticulum stress and oxidative stress in endothelial and macrophage cells

- exacerbate atherosclerosis in ApoCIII transgenic mice. *Lipids Health Dis.* 2018;17:220. <https://doi.org/10.1186/s12944-018-0867-5>
39. Kunz A, Dirnagl U, Mergenthaler P. Acute pathophysiological processes after ischaemic and traumatic brain injury. *Best Practice & Research Clinical Anaesthesiology*, Germany, 2010; 24:495-509.
 40. Jian KL, Rosenberg, GA. Matrix metalloproteinases and free radicals in cerebral ischemia. *Free Radic Biol Med*, v. 39, n. 1, p. 71-80, Jul 1 2005.
 41. Rocha TLA. Avaliação do status antioxidante, das citocinas inflamatórias e metaloproteínas em ratos anestesiados com isoflurano ou sevoflurano [Tese]. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho. Botucatu, 2018.
 42. De Jesus EF. Efeitos do peptídeo Bj-PRO-7a no remodelamento cardíaco de ratos hipertensos. Dissertação. Universidade Federal de Goiás, 2018.
 43. Priyadarsini KI. The Chemistry of Curcumin: From Extraction to Therapeutic Agent. *Molecules*. 2014;19:20091-112. DOI: <http://www.mdpi.com/1420-3049/19/12/20091>
 44. Dantas F. Identidade ao açafraão de Mara Rosa. *Revista Safra*, Goiânia, 20 de maio de 2016, Agricultura, pag 28. [Acesso 17 set 2017]. Disponível em <http://revistasafra.com.br/identidade-ao-acafrao-de-mara-rosa/>
 45. Barankevicz GB. Poder antioxidante da cúrcuma (*Curcuma longa* L.) nos parâmetros neuroquímicos em ratos induzidos a depressão. [Dissertação]. Piracicaba: Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. 2015.
 46. Custodio HE. Estudo do processo de extração das frações volátil e fixa de oleorresina de cúrcuma (*Curcuma longa* L.). [Dissertação]. Goiânia: Universidade Federal de Goiás, Escola de Agronomia. 2014.
 47. Silva Filho CRM, Souza AG, Conceição MM, Silva TG, Silva TMS, Ribeiro APL. Avaliação da bioatividade dos extratos de cúrcuma (*Curcuma longa* L., Zingiberaceae) em *Artemia salina* e *Biomphalaria glabrata*. *Rev. bras. farmacogn.* 2009;19(4):919-23.
 48. Pandey KB, Rizvi SI. Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxid Med Cell Longev.* 2009;2(5):270-78.
 49. Carvalho DM, Takeuchi KP, Geraldine RM, Moura CJ, Carneiro JES, Santos APM. Assessing Curcumin Solubility in Food-Grade Solvents. *Revista Processos Químicos*. 2015. 9. 23-26. 10.19142/rpq.v9i17.233.
 50. Aggarwal BB, Deb L, Prasad S. Curcumin Differs from Tetrahydrocurcumin for Molecular Targets, Signaling Pathways and Cellular Responses. *Molecules* 2015, 20(1), 185-205; <https://doi.org/10.3390/molecules20010185>
 51. Abdollahzadeh ME, Shokrzadeh M, Jaafari MR, Karami M, Mohammadi HR. Organ toxicity attenuation by nanomicelles containing curcuminoids: Comparing the protective

- effects on tissues oxidative damage induced by diazinon. *Iranian J. Basic Med Sci.* 2019. 22:17-24.
52. Chakraborty M, Bhattacharjee A, Kamath JV. Cardioprotective effect of curcumin and piperine combination against cyclophosphamide-induced cardiotoxicity. *Indian J Pharmacol.* 2017;49(1):65–70. doi:10.4103/0253-7613.201015
53. Benjamin EJ, Muntner P, Alonso A, Bittencourt MS, Callaway CW, Carson AP, Chamberlain AM, Chang AR, Cheng S, Das SR, Delling FN, Djousse L, Elkind MSV, Ferguson JF, Fornage M, Jordan LC, Khan SS, Kissela BM, Knutson KL, Kwan TW, Lackland DT, Lewis TT, Lichtman JH, Longenecker CT, Loop MS, Lutsey PL, Martin SS, Matsushita K, Moran AE, Mussolino ME, O'Flaherty M, Pandey A, Perak AM, Rosamond WD, Roth GA, Sampson UKA, Satou GM, Schroeder EB, Shah SH, Spartano NL, Stokes A, Tirschwell DL, Tsao CW, Turakhia MP, VanWagner LB, Wilkins JT, Wong SS, Virani SS; on behalf of the American Heart Association Council on Epidemiology and Prevention Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. Heart disease and stroke statistics-2019 update: a report from the American Heart Association. *Circulation.* 2019;139:e56–e528. DOI: 10.1161/CIR.0000000000000659.
54. HuaJin L, ChangHua W, Zengyong Q, Yawei X (2017) Protective effect of curcumin against myocardium injury in ischemia reperfusion rats. *Pharmaceutical Biology.* 2017;55(1):1144-48. DOI: 10.1080/13880209.2016.1214741 DOI: 10.1080/13880209.2016.1214741
55. J. Xiao, X. Sheng, X. Zhang, M. Guo, X. Ji. Curcumin protects against myocardial infarction-induced cardiac fibrosis via sirt1 activation in vivo and in vitro. *Drug Des. Dev. Ther.*, 10 (2016), pp. 1267-1277.
56. Kleindorfer D, Lindsell CJ, Brass L, Koroshetz W and Broderick JP: National US estimates of recombinant tissue plasminogen activator use: ICD-9 codes substantially underestimate. *Stroke* 39: 924-928, 2008.
57. Li W, Suwanwela NC, Patumraj S. Curcumin prevents reperfusion injury following ischemic stroke in rats via inhibition of NF- κ B, ICAM-1, MMP-9 and caspase3 expression. *Molecular Medicine Reports.* 2017;16:4710-20. DOI: 10.3892/mmr.2017.7205
58. Liu Z, Ran Y, Huang S, Wen S, Zhang W, Liu X, Ji Z, Geng X, Ji X, Du H, Leak RK, Hu X. Curcumin Protects against Ischemic Stroke by Titrating Microglia/Macrophage Polarization. *Frontiers in Aging Neuroscience.* 2017;9:1-10.
59. Cong Lan, Xinjian Chen, Yuxun Zhang, Wei Wang, Wei Eric Wang, Yukai Liu, Yue Cai, Hongmei Ren, Shuo Zheng, Lin Zhou, Chunyu Zeng. Curcumin prevents strokes in stroke-prone spontaneously hypertensive rats by improving vascular endothelial function. *BMC Cardiovascular Disorders.* 2018;18:43. DOI.org/10.1186/s12872-018-0768-6.

CAPÍTULO 2 – EFEITO DA CURCUMINA NAS CÉLULAS ENDOTELIAS HUMANAS SOB ESTRESSE OXIDATIVO

RESUMO

As pesquisas por compostos naturais que possam beneficiar o organismo, diante de injúrias celulares têm aumentado bastante. A curcumina é um pigmento proveniente do açafrão, que tem a capacidade de neutralizar as espécies reativas do oxigênio, originadas no processo de estresse oxidativo celular. A relevância dessa particularidade se dá em decorrência do aumento da mortalidade humana por doenças do sistema circulatório. Assim, o objetivo desse estudo foi investigar o efeito protetor ou citotóxico da curcumina padrão (Sigma Aldrich, Referência C1386) sobre as células endoteliais de veia umbilical humana (HUVEC) em normoxia e em estresse oxidativo (EO). Dessa forma, testou a curcumina em diferentes concentrações (0 μmol , 20 μmol , 50 μmol , 100 μmol e 1000 μmol) e por três períodos distintos (24 h, 48 h, 72 h) em cultivos celulares de HUVEC submetidos ou não ao estresse oxidativo, por meio de peróxido de hidrogênio a 1%. A viabilidade celular, a citotoxicidade e a concentração que inibe 50% da viabilidade celular (IC_{50}) foram obtidas a partir do Método de redução do sal de tetrazólio (MTT). Os resultados demonstraram que as células tratadas com 20 μmol de curcumina e nos tempos de 24 h e 48 h apresentaram melhor viabilidade celular e conseqüentemente, menor citotoxicidade. As células submetidas ao EO apresentaram um declínio na viabilidade, porém na exposição à 50 μmol de curcumina infere-se que ocorreu uma proteção celular. Neste estudo, concluiu-se que a curcumina apresentou efeito protetor em menores tempos de exposição celular (até 48 h) e menores concentrações, tanto em células em normoxia (20 μmol), quanto em estresse oxidativo (50 μmol).

Palavras-chaves: ácido fenólico, antioxidante, HUVEC

CHAPTER 2 – CURCUMIN EFFECT ON HUMAN ENDOTHELIAL CELLS UNDER OXIDATIVE STRESS

ABSTRACT

Phenolic compounds have been extensively researched due to their antioxidant action. Curcumin is a pigment from saffron, widely used as a spice, but with reports since the ancient times of its beneficial effects, including the ability to neutralize reactive oxygen species, originated in the process of oxidative stress. cell phone. Its chemical structure ($C_{21}H_{20}O_6$) enables antioxidant activity through active sites, which may undergo electron transfer oxidation and hydrogen abstraction. These particularities are important to ameliorate ischemia and reperfusion (I/R) injuries, given that circulatory system diseases are among the leading causes of mortality worldwide, especially heart diseases and stroke. Thus, the aim of this study was to investigate the antioxidant and cytotoxic action of standard curcumin (Sigma Aldrich, Reference C1386) on human umbilical vein endothelial cells (HUVEC). The molecule was used at 0 μmol , 20 μmol , 50 μmol , 100 μmol and 1000 μmol concentrations, and for three different times (24 h, 48 h, 72 h) in HUVEC cultures on normoxic state or under oxidative stress with 1% hydrogen peroxide. Cell viability, cytotoxicity and concentration inhibiting 50% of cell viability (IC_{50}) were obtained by MTT reduction assay. The results showed that cells treated with 20 μmol curcumin at 24 h and 48 h showed better cell viability and consequently lower cytotoxicity. We observed the oxidative stress promotion by the decrease of cell viability in the three-time and there was an antioxidant protection under 50 μmol curcumin treatment.

Keywords: antioxidant, HUVEC, phenolic compounds

1. INTRODUÇÃO

A curcumina é um composto fenólico proveniente do rizoma da cúrcuma ou açafrão (*Curcuma longa* L.), uma planta originária da Índia e do sudeste da Ásia. Seu principal uso é na culinária, como especiaria ou corante, mas na medicina oriental tem-se a substância como agente terapêutico restaurador da saúde. A literatura demonstra que a curcumina pode atuar em múltiplos alvos moleculares e modular diversas vias de transdução de sinal, o que lhe confere capacidade de atuar contra doenças cardiovasculares, inflamatórias, metabólicas, neurológicas, hepáticas, parasitárias e contra alguns tipos de câncer. Apesar disso, a curcumina apresenta baixa solubilidade aquosa, o que conseqüentemente diminui sua dispersão e biodisponibilidade no organismo e pode limitar seu uso como medicamento¹⁻⁴.

A estrutura química da curcumina ($C_{21}H_{20}O_6$) possibilita sua atividade antioxidante por meio de sítios ativos, que podem sofrer oxidação por transferência de elétrons e abstração de hidrogênio. Essas características são bastante desejáveis perante a injúria tecidual de isquemia e reperfusão (I/R), haja vista que as doenças do sistema circulatório estão entre as principais causas de mortalidade em todo o mundo, sobretudo os acometimentos cardíacos e acidentes vasculares encefálicos de origem isquêmica^{5,6}.

O evento isquêmico provoca alterações celulares e lesões críticas no endotélio vascular. A reoxigenação, apesar de essencial, ativa cascatas que exacerbam os danos da isquemia e a principal consequência é o excesso de espécies reativas do oxigênio (ERO), que pode ocorrer por depleção da capacidade antioxidante do sistema celular ou por produção em demasia, o que se caracteriza em estresse oxidativo (EO). A oxidação de componentes celulares substanciais como lipídeos, ácidos nucléicos e proteínas podem desorganizar as funções das células ou destruí-las de forma irreversível⁷.

Durante a reperfusão, o oxigênio introduzido (O_2) é reduzido inicialmente a superóxido (O_2^-), um oxidante fraco e instável que rapidamente é dismutado em peróxido de hidrogênio (H_2O_2), um mediador que não possui elétrons desemparelhados, apresenta maior estabilidade e também capacidade de se dispersar, o que possibilita ações distantes de seu local de síntese. O H_2O_2 pode ser produzido também pelos sistemas xantina oxidase, eNOS desacoplada, respiração mitocondrial e NADPH oxidase (NOX). Os estudos têm demonstrado que o maior produtor de ERO na vasculatura é complexo enzimático (Nox). Animais sob hipóxia crônica apresentaram maior expressão de Nox2 e Nox4 em células progenitoras endoteliais. Conseqüentemente a atividade de caspase3 e a porcentagem de apoptose nessas células também aumentaram^{8,9}.

Após o acidente vascular encefálico isquêmico, a reoxigenação provoca EO e resposta inflamatória exacerbada. Wang e colaboradores demonstraram o efeito anti-inflamatório do uso da curcumina em nanopartículas (NCUR), em encéfalos de camundongos submetidos à I/R. Após o retorno do oxigênio, a micróglia migrou para a área da penumbra (área de isquemia reversível) e também liberou citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-1 β , ERO) que amplificaram a inflamação e os danos celulares. Com o uso da NCUR, a expressão de marcadores de ação da micróglia M1/pró-inflamatória (IBa1 e CD68) foi significativamente menor. Esses mesmos autores demonstraram, *in vitro*, que a NCUR reduziu os danos mitocondriais e a apoptose na cultura de células endoteliais da microvasculatura cerebral¹⁰.

O uso da curcumina imediatamente antes de induzir-se uma injúria, de isquemia e reperfusão, em cardiomiócitos ativou a via de sinalização protetora JAK2/STAT3, que promoveu aumento de expressão de Bcl-2 e diminuição de caspase3, o que se validou com a visualização de uma menor porcentagem de área de infarto e diminuição da dosagem de enzimas de lesão miocárdica (LDH, CK-MB, Ca²⁺ATPase, Na⁺K⁺ATPase)¹¹.

Diante dos fatos, torna-se oportuno a realização de ensaios experimentais que avaliem a ação da curcumina, como uma possível alternativa viável na atenuação dos efeitos celulares decorrentes do estresse oxidativo. Considerando a importância do endotélio vascular, objetivou-se com esse trabalho avaliar o efeito antioxidante e citotóxico da curcumina padrão (Sigma Aldrich, Referência C1386) sobre as células endoteliais provenientes de cordão umbilical humano (HUVEC).

2. MATERIAIS E MÉTODOS

O estudo foi conduzido no laboratório Multiusuário de Estudo de Moléculas, Células e Tecidos da Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás (LMAMCT/EVZ/UFG).

2.1. Células e cultura

As células endoteliais (HUVEC) originárias da ATCC (American Type Culture Collection - Manassas, VA, USA) foram cultivadas em meio de cultura Dulbecco modificado de Eagle (DMEM) enriquecido com 10% de soro fetal bovino (SFB), penicilina e estreptomicina (10.000 U.I./ml - 10 mg/ml), 1% de anfotericina B e L glutamina (todos os

reagentes da Cultilab, Campinas, Brasil) e mantidas em incubadora umidificada a 37°C com uma atmosfera de 5% de CO₂, de acordo com adaptação de Manea¹².

Para o ensaio foram realizados três experimentos independentes em quintuplicata.

2.2. Ação da curcumina sobre as células endoteliais

O cultivo das células endoteliais de veia umbilical humana (HUVEC) ocorreu em incubadora umidificada, a 37°C e atmosfera de 5% de CO₂, com concentração celular de 1x10⁴ células/poço em placas de cultivo de 96 poços.

Utilizou-se a curcumina padrão (Sigma Aldrich, Referência C1386) diluída em meio de cultivo DMEM 1%, nas diferentes concentrações pré-estabelecidas, para a administração nos grupos, de acordo com a seguinte divisão:

a) Grupo controle

Grupo 1: células não tratadas com curcumina.

b) Quatro grupos expostos a curcumina (CUR), de forma contínua, por 24 h, 48 h e 72 h:

Grupo 2: adição de 20 µM de CUR em meio de cultivo;

Grupo 3: adição de 50 µM de CUR em meio de cultivo;

Grupo 4: adição de 100 µM de CUR em meio de cultivo;

Grupo 5: adição de 1000 µM de CUR em meio de cultivo.

2.3. Ensaio de estresse oxidativo por meio do peróxido de hidrogênio

As HUVEC foram semeadas em placas de cultivo de 96 poços, tratadas com as diferentes concentrações de curcumina e induzidas ou não ao estresse oxidativo. Para promover o estresse oxidativo utilizou-se o peróxido de hidrogênio a 1% (H₂O₂) diluído no meio de cultivo DMEM 1%, de acordo com as concentrações determinadas:

a) Grupo controle

Grupo 1: células não tratadas com curcumina e adicionadas H₂O₂.

b) Quatro grupos expostos a curcumina (CUR), de forma contínua, por 24 h, 48 h e 72 h, com posterior adição de H₂O₂, por 6 horas consecutivas:

Grupo 2: adição de 20 µM de CUR em meio de cultivo;

Grupo 3: adição de 50 µM de CUR em meio de cultivo;

Grupo 4: adição de 100 µM de CUR em meio de cultivo;

Grupo 5: adição de 1000 µM de CUR em meio de cultivo.

2.4 Ensaio de redução do sal de tetrazólio para análise de viabilidade celular

A análise de viabilidade celular se baseia na capacidade de as enzimas mitocondriais de células viáveis transformarem o MTT (metil-tiazolil-tetrazólio), em corante de formazano. A produção de formazano é reduzida quando a função redox mitocondrial está prejudicada ou as espécies reativas de oxigênio (ERO) estão aumentadas. Dessa forma, após os tratamentos, descartou-se o meio DMEM e adicionou-se 10 µl de tetrazólio MTT em cada poço. As placas foram incubadas por três horas e posteriormente, acrescentou-se 50 µl de dodecil sulfato de sódio (SDS – Vivantis Biochemical) a 10% diluído em HCl (0,01N) por poço para cessar a reação de MTT. As placas foram incubadas por 24 horas em temperatura ambiente e protegidas de luz.

A absorbância do corante convertido foi medida em comprimentos de onda de 540 nm por meio de espectrofotômetro (Awareness Technology Ine[®]/Stat Fax 2100). O valor da absorbância resultante de cada poço tratado, foi calculado, segundo a fórmula computacional: $\text{absorbância (tratamento)}/\text{absorbância (controle)} \times 100\%$, para se determinar a viabilidade celular. A partir dessa, calculou-se a citotoxicidade celular de cada poço, por meio da fórmula computacional: $100 - [\text{absorbância (tratamento)}/\text{absorbância (controle)} \times 100\%]$.

O valor da concentração de EEC que inibe 50% da viabilidade celular (Inhibitory concentration – IC₅₀, em µmol) foi calculado pelo programa estatístico Graph Pad Prism 5 (Graph-Pad Software Inc., San Diego, CA,USA).

3. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para normalizar os dados obtidos no ensaio de redução do sal de tetrazólio (valor da absorbância) e remover possíveis outliers (valores atípicos), um modelo matemático rigoroso foi empregado para que os valores, que se apresentassem superiores e inferiores a esses intervalos, fossem retirados dos dados da quintuplicata. Foi realizada a análise de variância (ANOVA) e o teste de *t* (5% de significância) para comparar as médias de absorbância. Utilizou-se também os dados da absorbância para se obter o IC₅₀ (concentração de um composto, que promove a inibição de 50% da viabilidade celular), por meio do software Graphpad Prism 5 (GraphPad software, Inc, La Jolla, CA).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O uso experimental da curcumina (CUR) nas células endoteliais de veia umbilical humana (HUVEC) em condição de normoxia não demonstrou diferença estatística na viabilidade celular entre os grupos de 24 e 48 h (Figura 1). Foi observada uma maior taxa percentual de sobrevivência no grupo tratado por 24 h, principalmente pela ausência de diferença entre as concentrações de CUR utilizadas e o controle ($p < 0,05$). Em 48 h a concentração de 50 μmol demonstrou maior viabilidade celular em relação às dosagens crescentes dos grupos tratados ($p < 0,05$). Contudo, nas 72 h, essa mesma dosagem apresentou uma menor taxa percentual de sobrevivência celular, além de ter se diferenciado estatisticamente do controle.

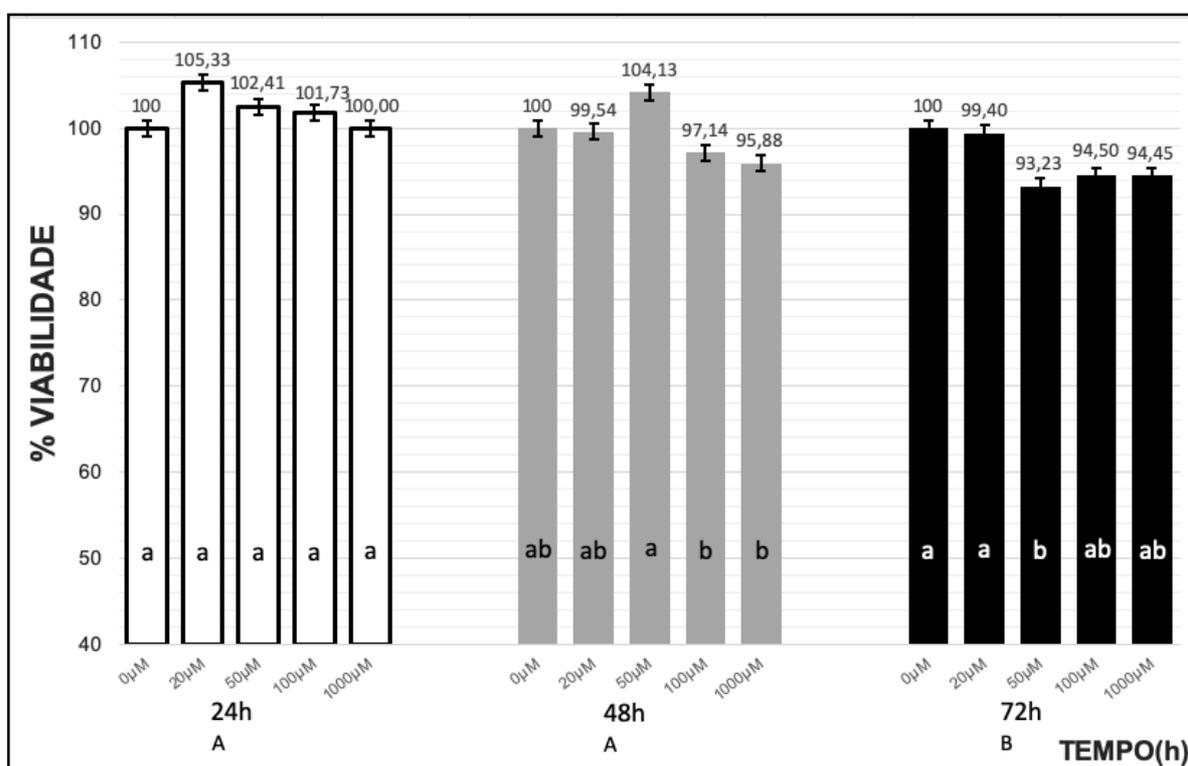


Figura 1 – Ensaio de viabilidade celular pela redução do sal de tetrazólio (MTT). Os valores foram obtidos a partir da absorbância registrada em espectrofotômetro, no comprimento de onda de 532nm. As letras minúsculas indicam a diferença estatística entre as concentrações e as maiúsculas entre os tempos de exposição (teste de t com $p < 0,05$).

A maioria dos experimentos relacionados utilizou menores tempos de tratamento, ademais, os estudos apontam que a CUR apresenta efeito protetor em concentrações mais baixas, seguida de potencial citotoxicidade em dosagens mais elevadas. Yang e colaboradores, por meio do teste de MTT encontraram morte de cardiomioblastos em quantidades de 20 e 25 μmol de CUR, em tratamento de 24h. Em cultura de cardiomiócitos, Zhu e pesquisadores,

assim como no presente estudo, também encontraram melhor viabilidade em menores tempo e concentração (10 μmol em 24h), entretanto até a quantia de 20 μmol não observaram alterações metabólicas^{14,15}.

Em relação à citotoxicidade do composto, os dados obtidos mostraram que houve diferença estatística nas variáveis de tempo e de concentrações utilizadas de CUR (Tabela 1). Em 24h possivelmente não houve citotoxicidade, em razão de não ter sido observada diferença significativa entre as dosagens empregadas. Em 48 h notou-se diferença estatística significativa a partir de 1000 μmol e, em 72 h, a diferença foi notada mais precocemente, como foi observado na dosagem de 50 μmol .

As variações observadas especificamente em 50 μmol , tanto em 48h quanto em 72h, podem ser atribuídas à sensibilidade da molécula, que é referenciada como instável, hidrofóbica e de baixo metabolismo. Abdollahzadeh e colaboradores afirmaram que a CUR em preparações nanomicelares (NCUR) atuou significativamente melhor do que CUR *in natura*, o que representaria um modelo promissor para a utilização da substância, devido à uma melhor biodisponibilidade em soluções aquosas, a maior estabilidade física e menor propensão a citotoxicidade. Esses mesmos autores relataram ainda que a capacidade antioxidante da NCUR também superou o uso de CUR natural^{16,17}.

Tabela 1 – Valores de citotoxicidade da curcumina em células endoteliais de veia umbilical humana, em relação aos tempos de exposição 24h, 48h e 72h e a concentração de curcumina.

TEMPO	TRATAMENTO	%	TESTE T
24h B	Controle	0	a
	20 μM	-5,33	a
	50 μM	-2,41	a
	100 μM	-1,73	a
	1000 μM	0,00	a
48h B	Controle	0	b
	20 μM	0,46	ab
	50 μM	-4,13	b
	100 μM	2,86	ab
	1000 μM	4,12	a
72h A	Controle	0	c
	20 μM	0,60	bc
	50 μM	6,77	a
	100 μM	5,50	ab
	1000 μM	5,55	ab

Legenda: (%) percentagem de viabilidade celular; (μM) micromolaridade; as letras minúsculas indicam a diferença estatística entre as concentrações e as maiúsculas entre os tempos de exposição (teste de t com $p < 0,05$).

Nesse ensaio, foi calculada a concentração de CUR, que inibiu 50% da viabilidade celular (IC_{50}), nos tempos que apresentaram diferença estatística. Nesse caso, em 48h foi obtida IC_{50} de 94,94 μmol e em 72h, a concentração diminuiu para 20,58 μmol . A literatura cita que quanto menor o valor de IC_{50} , maior é a capacidade de uma substância promover alterações metabólicas, que possam desencadear ou não em morte celular. Doses menores de CUR já foram relatadas como citotóxicas: Daverey e Agrawal constataram diminuição na viabilidade celular a partir de 5 μmol de CUR em 24h. Testaram também as concentrações de 40 μmol , 50 μmol , 60 μmol e 70 μmol que foram tóxicas tanto em células normais (astrócitos) quanto em células tumorais (glioblastomas)¹⁸.

Sabe-se que o processo de isquemia e reperfusão celular ocasiona o aumento na produção de espécies reativas de oxigênio. Esse processo pode ser induzido de forma experimental expondo as células ao peróxido de hidrogênio (H_2O_2), dessa forma, no presente estudo, as HUVEC foram submetidas ao ensaio de estresse oxidativo, por meio de H_2O_2 na concentração de 1%, para se ter o referido efeito. Esse exato modelo experimental *in vitro* também foi utilizado por Gong e colaboradores que constataram, por meio de imunofluorescência, a produção esperada de ERO pelas mesmas células¹³. O gráfico da Figura 2 mostra o efeito que o H_2O_2 pode ter induzido nas células, em razão do decréscimo de viabilidade celular, que pode ser observado nas três variáveis de tempo utilizadas, principalmente quando comparadas aos grupos em normoxia da Figura 1.

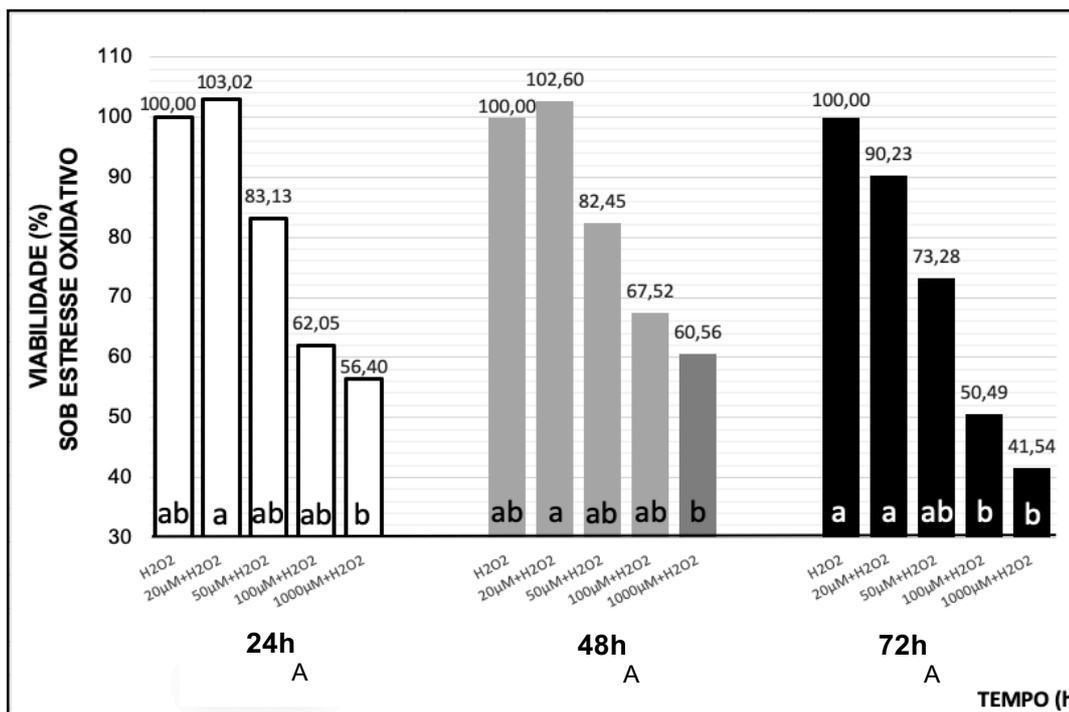


Figura 2 – Ensaio de viabilidade celular perante o estresse oxidativo, pelo método de redução do sal de tetrazólio. Análise das médias (em porcentagem) de viabilidade celular por concentração de curcumina em relação ao tempo de exposição (24h, 48h e 72h). As letras minúsculas indicam a diferença estatística entre as concentrações e as maiúsculas entre os tempos de exposição (teste de t com $p < 0,05$).

Na Figura 2 é possível observar os resultados da exposição celular à CUR, antes da indução de EO. Apesar de não ter se distinguido estatisticamente do grupo controle como esperado, a utilização de 20 μmol de CUR demonstrou maior citoproteção, pois a média obtida ultrapassou o referido controle, tanto em 24 h, quanto em 48 h. Ademais, os dados indicam que não houve diferença estatística significativa entre a variável de tempo (24h, 48h e 72h). Já entre as doses utilizadas nota-se, que assim como nas células em normoxia, as células em estresse oxidativo apresentaram uma alteração na viabilidade de acordo com o aumento na concentração de CUR usada, o que pode ser visto estatisticamente.

O valor de IC_{50} encontrado sob condição de EO foi 52,21 μmol , 47,92 μmol e 56,99 μmol para respectivamente 24h, 48h e 72h. Esses valores corroboram com as dosagens de tratamento utilizadas por outros autores que se limitam a no máximo 50 μmol . Li e colaboradores utilizaram CUR nessa dosagem como controle positivo para comparar o efeito antioxidativo de X22, um derivado da imidazopiridina; Yang e colaboradores obtiveram dosagem e tempo máximos de 10 μmol e 24h visando atenuar a morte de astrócitos, induzida por metilmercúrio. Os relatos da literatura mostraram que concentrações crescentes de CUR induziram maiores taxas de mortalidade celular. Piantino e demais pesquisadores apontaram

que o uso de 10 e 25 μ mol de curcumina provocou apoptose em respectivamente 31,9% e 52,2% de células tumorais prostáticas e ao aumentarem essa concentração para 50 μ mol, houve quase 100% de morte dessa linhagem celular, o que demonstrou o efeito antitumoral da molécula^{19,20,21}.

A tabela 2 representa a citotoxicidade do tratamento com CUR, nas HUVEC em meio contendo H₂O₂:

Tabela 4 – Valores de citotoxicidade da curcumina em células endoteliais de veia umbilical humana expostas ao H₂O₂, em relação aos tempos de exposição 24h, 48h e 72h e concentração de curcumina (μ M).

TEMPO	TRATAMENTO	%	TESTE T
24h A	Controle	0	c
	20 μ M	0	c
	50 μ M	16,87	bc
	100 μ M	37,95	ab
	1000 μ M	43,60	a
48h A	Controle	0	b
	20 μ M	0	b
	50 μ M	17,55	ab
	100 μ M	18,58	a
	1000 μ M	39,44	a
72h A	Controle	0	c
	20 μ M	11,44	c
	50 μ M	25,69	bc
	100 μ M	48,82	ab
	1000 μ M	54,13	a

Legenda: (%) percentagem de viabilidade celular; as letras minúsculas indicam a diferença estatística entre as concentrações e as maiúsculas entre os tempos de exposição (teste de t com $p < 0,05$).

Ao considerar os achados deste experimento, as evidências sugerem que CUR 20 μ mol não afetou significativamente a viabilidade das HUVEC. Além disso, essa dosagem preveniu a citotoxicidade induzida pelo H₂O₂ nos tempos 24 e 48 h. Esses dados corroboram com os achados de Sun e colaboradores, que avaliaram o mecanismo de senescência celular por meio de peróxido de hidrogênio e observaram que esse promoveu um decréscimo na viabilidade das células endoteliais, o qual foi atenuado pela utilização prévia de CUR, na concentração de 20 μ mol. Já em células epiteliais retinianas, Ramos de Carvalho e colaboradores perceberam, que a exposição à essa dosagem induziu efeitos citotóxicos significativos tanto em normoxia, quanto sob estresse oxidativo. Eles descreveram ainda que ao aumentarem as concentrações de CUR, quase nenhuma célula viável foi encontrada, o que pode ser inferido que a citotoxicidade ocorreu por efeitos pró-oxidativos^{22,23}.

5. CONCLUSÃO

A curcumina apresentou efeito protetor na concentração de 20 μmol e no tempo de exposição de até 48 h, tanto em células HUVEC em normoxia, quanto em submetidas ao estresse oxidativo.

REFERÊNCIAS

1. Prabhakaran Nair KP. The Agronomy and Economy of Turmeric and Ginger: the Invaluable Medicinal Spice Crops. London:Elsevier 2013:17-20p
2. Banik U, Parasuraman S, Adhikary AK, Orthman NH. Curcumin: the spicy modulator of breast carcinogenesis. *Jour Exp Clin Cancer Res.* 2017;36(1):98.
3. Marchi JP, Tedesco L, Melo AC, Frasson AC, França VF, Sato SW, Lovato ECW. *Curcuma longa* L., o açafrão da terra, e seus benefícios medicinais. *Arq. Cienc. Saúde UNIPAR, Umuarama.* 2016;20(3):189-194.
4. Kunnumakkara AB, Harsha C, Banik K, Sailo BL, Bordoloi D, Rajesh V, Gupta SC, Aggarwal BB. Is curcumin bioavailability a problem in humans: lessons from clinical trials. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology.* 2019. doi:10.1080/17425255.2019.1650914
5. Priyadarsini KI. The Chemistry of Curcumin: From Extraction to Therapeutic Agent. *Molecules.* vol. 19, n. 12, p. 20091-112, 2014. DOI: <http://www.mdpi.com/1420-3049/19/12/20091>
6. Benjamin EJ, Muntner P, Alonso A, Bittencourt MS, Callaway CW, Carson AP, Chamberlain AM, Chang AR, Cheng S, Das SR, Delling FN, Djousse L, Elkind MSV, Ferguson JF, Fornage M, Jordan LC, Khan SS, Kissela BM, Knutson KL, Kwan TW, Lackland DT, Lewis TT, Lichtman JH, Longenecker CT, Loop MS, Lutsey PL, Martin SS, Matsushita K, Moran AE, Mussolino ME, O'Flaherty M, Pandey A, Perak AM, Rosamond WD, Roth GA, Sampson UKA, Satou GM, Schroeder EB, Shah SH, Spartano NL, Stokes A, Tirschwell DL, Tsao CW, Turakhia MP, VanWagner LB, Wilkins JT, Wong SS, Virani SS; on behalf of the American Heart Association Council on Epidemiology and Prevention Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. Heart disease and stroke statistics-2019 update: a report from the American Heart Association. *Circulation.* 2019;139:e56–e528. DOI: 10.1161/CIR.0000000000000659.
7. Kalogeris T, Baines CP, Krenz M, Korthuis RJ. Ischemia/Reperfusion. *Comprehensive Physiology.* 2016;7:113-70. doi:10.1002/cphy.c160006
8. Capettini LSA. O peróxido de hidrogênio (H₂O₂) como fator relaxante derivado do endotélio na aorta de camundongo: um papel para a óxido nítrico sintase neuronal (nNOS). [Mestrado] Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. Belo Horizonte 2007.

9. Wang EL, Jia MM, Luo FM, Li T, Peng JJ, Luo XJ, Song FL, Yang JF, Peng J, Liu B. Coordination between NADPH oxidase and vascular peroxidase 1 promotes dysfunctions of endothelial progenitor cells in hypoxia-induced pulmonary hypertensive rats. *European Journal of Pharmacology* (2019), doi: <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2019.172459>.
10. Wang Y, Luo J, Li SY. Nano-curcumin simultaneously protects the blood-brain barrier and reduces M1-microglial activation during cerebral ischemia- reperfusion injury. *ACS Appl. Mater. Interfaces*. 2019 Jan 30;11(4):3763-3770. doi: 10.1021/acsami.8b20594.
11. Liu H, Wang C, Qiao Z, Xu Y. Protective effect of curcumin against myocardium injury in ischemia reperfusion rats. *Pharm Biol*. 2017;55(1):1144–1148. doi:10.1080/13880209.2016.1214741
12. Manea SA, Fenyó IM, Manea A. c-Src tyrosine kinase mediates high glucose-induced endothelin-1 expression. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 2016;123–130.
13. Gong L, Lei Y, Liu Y, Tan F, Li S, Wang X, Xu M, Cai W, Du B, Xu F, Zhou Y, Han H, Sun H, Qiu L. Vaccarin prevents ox-LDL-induced HUVEC EndMT, inflammation and apoptosis by suppressing ROS/p38 MAPK signaling. *Am J Transl Res*. 2019;11(4):2140–2154.
14. Yang X, Jiang H, Shi Y. Upregulation of heme oxygenase-1 expression by curcumin conferring protection from hydrogen peroxide-induced apoptosis in H9c2 cardiomyoblasts. *Cell Biosci*. 2017;7:20.
15. Zhu, P., Yang, M., He, H., Kuang, Z., Liang, M., Lin, A., Liang, S., Wen, Q., Cheng, Z., Sun, C. Curcumin attenuates hypoxia/reoxygenation induced cardiomyocyte injury by downregulating Notch signaling. *Mol Med Rep*. 2019; 20;2:1541-1550. <https://doi.org/10.3892/mmr.2019.10371>
16. Carvalho DM, Takeuchi KP, Geraldine RM, Moura CJ, Carneiro JES, Santos APM. Assessing Curcumin Solubility in Food-Grade Solvents. *Revista Processos Químicos*. 2015. 9. 23-26. 10.19142/rpq.v9i17.233.
17. Abdollahzadeh ME, Shokrzadeh M, Jaafari MR, Karami M, Mohammadi HR. Organ toxicity attenuation by nanomicelles containing curcuminoids: Comparing the protective effects on tissues oxidative damage induced by diazinon. *Iranian J. Basic Med Sci*. 2019. 22:17-24.
18. Daverey A, Agrawal SK. Curcumin alleviates oxidative stress and mitochondrial dysfunction in astrocytes. *Neuroscience*, 2016; 333, 92–103. doi:10.1016/j.neuroscience.2016.07.012
19. Li W, Wang L, Huang W, Skibba M, Fang Q, Xie L, Wei T, Feng Z, Liang G. Inhibition of ROS and inflammation by an imidazopyridine derivative X22 attenuate high fat diet-induced arterial injuries. *Vascul Pharmacol*. 2015; 72: 153-162. DOI: 10.1016/j.vph.2015.05.006

20. Yang B, Yin C, Zhou Y, Wang Q, Jiang Y, Bai Y, Qian H, Xing G, Wang S, Li F, Feng Y, Zhang Y, Cai J, Aschner M, Lu R. Curcumin protects against methylmercury-induced cytotoxicity in primary rat astrocytes by activating the Nrf2/ARE pathway independently of PKC δ . *Toxicology*. 2019;425,152248. DOI:<https://doi.org/10.1016/j.tox.2019.152248>
21. Piantino CB, Salvadori FA, Ayres PP, Kato RB, Srougi V, Leite KR, Srougi M. An evaluation of the anti-neoplastic activity of curcumin in prostate cancer cell lines. *Int. Braz J Urol*. 2009;35(3):354-361. <http://dx.doi.org/10.1590/S1677-55382009000300012>.
22. Sun, Y., Hu, X., Hu, G., Xu, C., Jiang, H. Curcumin attenuates hydrogen peroxide-induced premature senescence via the activation of SIRT1 in human umbilical vein endothelial cells. *Biol. Pharm. Bull.* 2015;38:1134–1141. DOI: <https://doi.org/10.1248/bpb.b15-00012>
23. Ramos de Carvalho JE, Verwoert MT, Vogels IMC, Schipper-Krom S, Van Noorden CJF, Reits EA, Klaassen I, Schlingemann RO. Modulation of the Proteasome Pathway by Nano-Curcumin and Curcumin in Retinal Pigment Epithelial Cells. *Ophthalmic Res*. 2018;59(2):98-109. DOI: 10.1159/000481261.

CAPÍTULO 3 – CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO ETANÓLICO DO AÇAFRÃO (*Curcuma longa* L.) DE MARA ROSA-GO

RESUMO

A *Curcuma longa* L. é uma planta perene, de ocorrência natural na Índia e no sudeste da Ásia. No Brasil, ela é conhecida como açafrão ou cúrcuma e sua importância vai além do uso como corante ou especiaria, uma vez que as pesquisas têm demonstrado seu alto potencial terapêutico, principalmente devido aos pigmentos curcuminoides presentes em seus rizomas. Esse trabalho objetivou avaliar qualitativa e quantitativamente os componentes antioxidantes presentes no extrato etanólico da cúrcuma (EEC), proveniente do município de Mara Rosa-GO. Para a fabricação do extrato dos rizomas da planta, utilizou-se o etanol para promover a extração da curcumina e os métodos de determinação de compostos fenólicos, teor de curcumina e ação antioxidante foram respectivamente, o teste de Folin-Ciocalteu, a análise por HPLC-Fluorescence e método do DPPH. Os resultados demonstraram a presença polifenóis das classes dos ácidos fenólicos e dos curcuminoides no EEC, com 16,7% de teor de curcumina, além disso, a quantidade de antioxidante necessária para reduzir em 50% a concentração inicial de DPPH, foi de 18,1 $\mu\text{mol/g}$. Dessa forma constatou-se que o EEC apresenta atividade antioxidativa.

Palavras-chaves: curcumina, cromatografia, isquemia, rizoma.

CHAPTER 3 - CHARACTERIZATION OF THE ETHANOLIC EXTRACT OF MARA ROSA-GO SAFFRON (*Curcuma longa* L.)

ABSTRACT

Curcuma longa L. or turmeric is a perennial plant from India and Asia Southeast, usable as a colorant or spice, but its have been shown the high therapeutic potential, mainly due to the curcuminoides pigments present in their rhizomes. This work aims to evaluate qualitatively and quantitatively the antioxidant components present in the ethanolic extract of turmeric (EET), obtained in Mara Rosa, Goias, Brazil. To process the rhizome extracts, we used ethanol to promote the extraction of curcumin and to determinate the phenolic compounds, curcumin content and antioxidant action, we used the Folin-Ciocalteu test, an HPLC-Fluorescence analysis and DPPH analysis. The results demonstrated the presence of phenolic acid and curcuminoid, in addition to 16.7% of the curcumin content and the amount of antioxidant needed to reduce the initial DPPH concentration by 50% was 18.1 $\mu\text{mol/g}$. The EET showed antioxidant activity.

Keywords: chromatography, curcumina, ischemia, rhizomes.

1. INTRODUÇÃO

A *Curcuma longa* L., conhecida tradicionalmente por açafrão ou cúrcuma, é uma planta perene, de longas ramificações, pertencente à família das Zingiberaceae, cuja origem se deu no sudeste da Ásia e nos morros das florestas tropicais da Índia. A porção mais comumente utilizada dessa herbácea é a raiz ou rizoma, que apresenta uma pigmentação amarela intensa repleta de substâncias bioativas. Esses pigmentos são empregados em diversas áreas, como a alimentícia, a medicinal, a cosmética e a têxtil¹⁻³.

O cultivo no Brasil foi estabelecido principalmente no Centro-Oeste, região de clima e solo favoráveis ao desenvolvimento da planta. Em Goiás, a Cooperativa dos Produtores de Açafrão de Mara Rosa (Cooperaçafrão) tem produzido de 800 a mil toneladas de açafrão desidratado por ano, o que tem movimentado a economia e abastecido o mercado interno. O produto também é exportado, porém em menor escala, para Israel e Índia quando esses encontram-se no período de entressafra, pois eles são considerados os maiores fornecedores mundiais. Em 2016, a região de Mara Rosa obteve o selo ou registro de Identidade Geográfica do Estado de Goiás para a produção de açafrão, pelo Instituto Nacional de Propriedade Industrial, o que agregou valor ao produto e valorizou a localidade^{4,5,6}.

Sabe-se que o sistema de saúde brasileiro preconiza o uso da fitoterapia e, em 2009, o Ministério da Saúde publicou a Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao Sistema Único de Saúde (RENISUS), em que se encontra listada a cúrcuma. Esse interesse pela *C. longa* L. tem ocorrido em virtude de se ter relatos dos povos da antiguidade oriental, dos inúmeros efeitos benéficos da planta tais como: anti-inflamatório, antibacteriano, antifúngico, antitumoral, antiviral, cicatrizante, hipoglicemiante, neuroprotetor, antiparasitário, imunomodulador e antioxidante. Esse último tem sido extensamente estudado, em razão do aumento dos índices de mortalidade por doenças crônicas não transmissíveis (DCNT), como por exemplo os eventos isquêmicos^{7,8}.

As pesquisas têm demonstrado que a curcumina, principal pigmento da cúrcuma, neutraliza as espécies reativas do oxigênio e as citocinas inflamatórias, decorrentes das injúrias que desencadeiam o estresse oxidativo⁹. Destarte, o objetivo dessa pesquisa foi realizar a caracterização dos compostos bioativos e da capacidade antioxidante dos rizomas da *Curcuma longa* L, provenientes de Mara Rosa, previamente à sua utilização, *in vitro*, em tecidos submetidos ao estresse oxidativo.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Os ensaios foram realizados no Laboratório Multiusuário de Avaliação de Moléculas, Células e Tecidos da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Goiás (LAMAMCT/EVZ/UFG) e no Laboratório de Nanotecnologia Farmacêutica do Centro de Pesquisa, Desenvolvimento Tecnológico e Inovação em Fármacos, Medicamentos e Cosméticos, da Faculdade de Farmácia da UFG (FARMATEC/FF/UFG).

2.1. Obtenção do extrato etanólico da curcumina – EEC (*Curcuma longa* L.)

Os rizomas da *Curcuma longa* L. foram provenientes da Cooperativa de Produtos do Açafão de Mara Rosa (Cooperaçafão) localizada no Município de Mara Rosa, estado de Goiás, Brasil.

O processamento de obtenção do extrato bruto iniciou-se com a retirada dos rizomas da terra, com posterior lavagem e secagem em estufa para serem processados. Posteriormente, 100g do material seco e triturado foi adicionado a 1000 ml de etanol absoluto, que em seguida passou por percolação a frio. O sobrenadante foi filtrado e o solvente evaporado em rotoevaporador (IKA® RV 05 Basic)¹⁰.

O extrato bruto obtido foi armazenado em refrigerador, com todas as etapas protegidas da fotodegradação.

2.2. Caracterização do extrato etanólico da curcumina – EEC (*Curcuma longa* L.)

2.2.1. Determinação de fenólicos totais

Os compostos fenólicos foram determinados por meio da utilização do reagente de Folin-Ciocalteu, seguindo a metodologia de Waterhouse (2002)¹¹, com leitura por espectrofotometria à 700 nm. Com o estabelecimento da curva padrão do ácido gálico, pôde-se quantificar a amostra do extrato. Os resultados foram expressos em miligramas de equivalente de ácido gálico (EAG) por 100 gramas de amostra.

2.2.2. Método analítico de quantificação da curcumina

O teor de curcumina no extrato foi determinado por HPLC-Fluorescence. A análise foi realizada pelo sistema Agilent HPLC 1260 Infinity (Agilent, EUA), com uma coluna Eclipse SDB C18 (250 X 4,6 mm, 5µm) à 35 °C. A fase móvel consistiu na mistura acetonitrila: ácido acético 0,4% (45:55, v / v), no fluxo de 1 mL/min. O volume de injeção foi

de 10 µL e a detecção da curcumina com excitação de 429 nm e emissão de 539 nm. Soluções do padrão de curcumina (Sigma Aldrich, Referência C1386) foram preparadas em diferentes concentrações, utilizando acetonitrila.

Após a padronização, utilizou-se aproximadamente 50 mg do extrato, homogeneizado previamente, adicionado de 10 ml de acetonitrila. A mistura foi agitada em vortex por três minutos. Uma alíquota do extrato já solubilizado foi então diluída (fator de diluição final: 1000) em acetonitrila e injetada no HPLC-Fluorescence.

A análise foi realizada em triplicata.

2.2.3. Atividade antioxidante por DPPH

Determinou-se a atividade antioxidante do EEC pelo método do DPPH (2,2 difenil-1-picrilhidrazil), de acordo com metodologia proposta por Rufino et al. (2007)¹². O grau de descoloração do radical DPPH pela ação dos antioxidantes, foi medido em triplicata, por meio de espectrofotometria, com concentração de 0,1 mg.mL⁻¹ e os resultados foram expressos em % de descoloração. O ensaio permaneceu em repouso por 15 minutos e, em seguida, foi feita a leitura no espectrofotômetro ao comprimento de onda de 520 nm.

Efetuuou-se os cálculos com o auxílio da Equação 1:

$$\% \text{ de descoloração do DPPH} = \left(\frac{-1 \text{ Abs controle} - \text{Abs branco}}{\text{Abs controle}} \right) \times 100$$

Em que:

Abs controle = absorbância da solução de DPPH sem a amostra;

Abs amostra = absorbância da amostra com o DPPH.

A determinação da atividade antioxidante foi expressa em equivalente de trolox, com base em uma curva de calibração de trolox com concentrações que variaram de 0,05 a 0,3 µmol/ml.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A eleição do etanol como o solvente para a extração da curcumina (CUR) dos rizomas foi feita de acordo com os critérios elencados na literatura, que demonstram as melhores substâncias para a solubilização dos curcuminóides. Esses compostos caracterizam-se como hidrofóbicos, ou seja, a utilização de água como solvente diminui a eficácia na extração da CUR. Carvalho e colaboradores demonstraram que a solubilidade dessa molécula em água foi de 1,3 mg.L⁻¹, enquanto em etanol (99,5%) esse valor se elevava para 8895,9

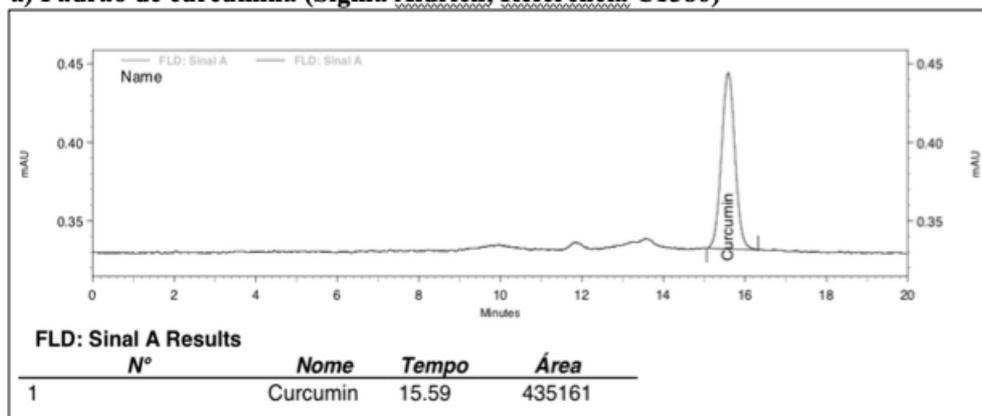
mg.L⁻¹. Solventes, como a acetona e o metanol, também são capazes de extrair a molécula, entretanto os mercados farmacêutico e alimentício prezam pelo uso do etanol, para se diminuir o risco à saúde do consumidor, já que ele demonstra um alto poder biodisponibilizador de curcuminoide¹³.

No presente extrato etanólico da curcumina (EEC) de Mara Rosa, obteve-se a curva padrão do ácido gálico pelo teste de Folin-Ciocalteu e foi obtido um teor de constituintes fenólicos totais (CFT) de 691,49 mg de EAG/100 g. Ao comparar-se esse valor ao da curcumina pura, adquirida comercialmente (Sigma Aldrich), percebeu-se que seu valor era inferior (495 ± 8 mg de EAG/100 g), o que pode ser atribuído aos demais componentes do extrato. O ácido gálico é um composto fenólico reconhecido como potente neutralizador de espécies reativas do oxigênio. Seu uso é comum em indústrias farmacêutica, cosmética e alimentícia e seu efeito terapêutico, assim como a CUR, já demonstrou ação antibacteriana, antialérgica, anti-inflamatória e antioxidante. Em razão disso, o valor de CFT pode ser determinado em termos de equivalente de ácido gálico, haja vista que é um composto de referência bastante indicado¹⁴.

Santos e Silva analisaram o CFT do extrato hidroetanólico do açafão obtido no comércio do município de Itapetinga (BA), o qual demonstrou um valor inferior ($253,24 \pm 1,72$ mg de EAG/100 g) ao EEC em questão, o que pode ocorrer em razão da fotodegradação ou a partir de fatores ambientais do cultivo da planta, naquela região. Os experimentos de Naksuriya & Okonogi mostraram a importância do efeito em conjunto da CUR e do ácido gálico, uma vez que isoladamente a CUR apresentava uma atividade antioxidante menor que a do ácido gálico, porém ao associar esses dois compostos percebia-se um efeito antioxidante sinérgico, o que não ocorreu ao associar a CUR com o ácido ascórbico ou a xantona^{15,16}.

Dessa forma, verificou-se também a marcação da curcumina no EEC do açafão de Mara Rosa, por meio da cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE ou HPLC). Essa técnica é bastante consolidada nas pesquisas, já que permite a avaliação qualitativa e quantitativa do analito das amostras. A separação e a identificação das substâncias ocorreram por meio do fracionamento das moléculas de acordo com suas propriedades físicas e químicas. Dessa forma, os tempos de retenção e os respectivos picos das amostras do extrato em questão, foram comparados com o padrão de curcumina adquirido comercialmente e no tempo de 15,1 minutos identificou-se a molécula no EEC (Figura 1)¹⁷.

a) Padrão de curcumina (Sigma Aldrich, Referência C1386)



b) Amostra 1 do EEC

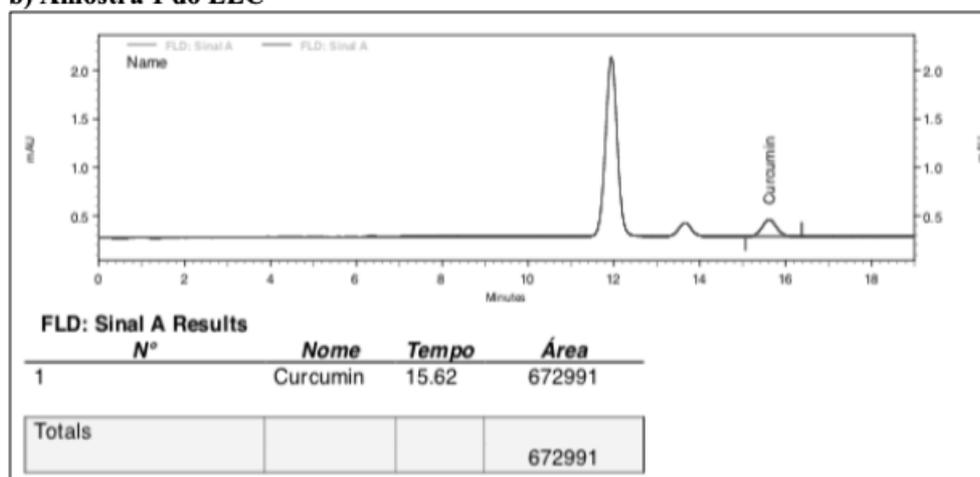


FIGURA 1 – Cromatograma da molécula de curcumina. a) Tempo de retenção e área da curcumina padrão; b) Gráficos da amostra do extrato etanólico da *Curcuma longa* L. (EEC) proveniente de Mara Rosa – Goiás, demonstrando o picos de curcumina encontrado.

Por meio dos dados da curva analítica da curcumina, calculou-se a concentração dessa substância no extrato (Figura 2), que apresentou um teor médio de 16,7% (Tabela 1). Sabe-se que o teor de curcumina na planta pode variar em razão de fatores como tipo de solo, localização geográfica, clima, espaçamento entre as plantas, tipo de adubação mineral, período de estocagem dos rizomas, exposição à luminosidade e outros mais. Camatari (2017) e colaboradores relataram um teor de 26,52% de curcumina, no pó comercial obtido da Cooperaçafrão, mediante extração por etanol e análise por HPLC. Akbar et al. (2016) encontraram valores discrepantes em diferentes regiões da Índia (0,4% a 7,2%), percebendo que o teor de curcumina diminuía progressivamente em altitudes mais baixas^{18,19,20}.

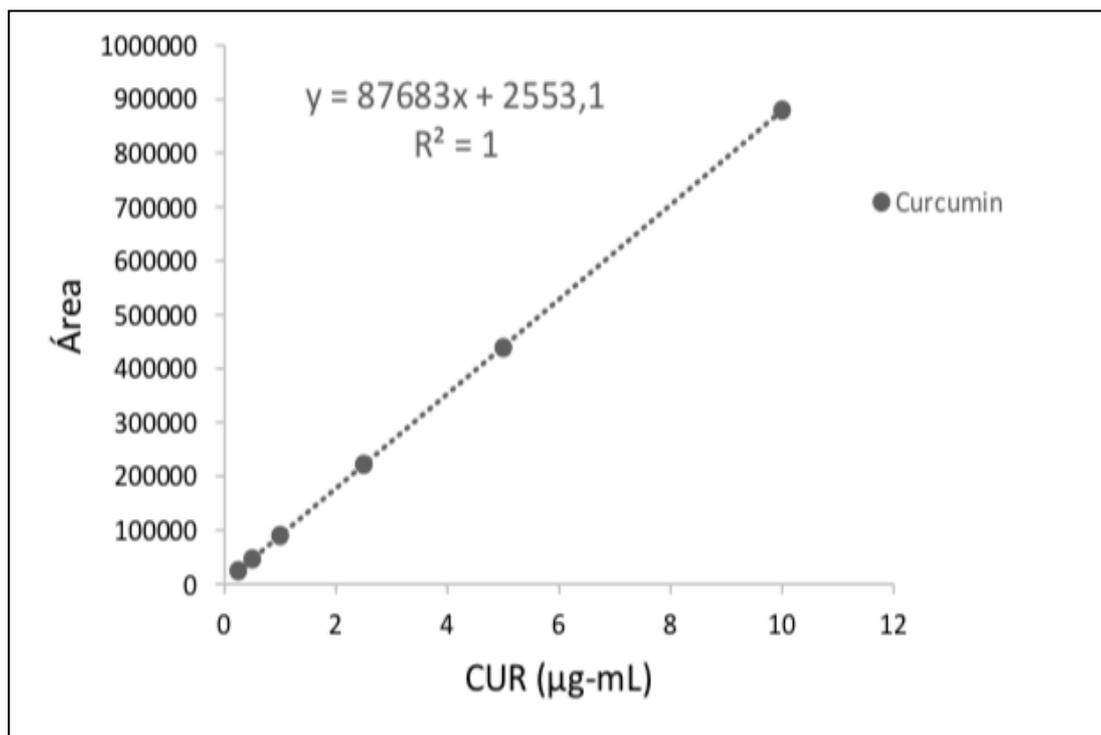


Figura 2 – Imagem representativa da curva de calibração, equação e coeficiente de determinação do padrão curcumina.

Tabela 1 – Resultados da pureza de curcumina presente no extrato etanólico do açafrão de Mara Rosa.

HPLC					
Amostra	Área	[CUR] (µl/ml)	[] Fator dil. (CUR mg final)	Peso do extrato (mg)	Teor de CUR (%)
EEC 1	672991	7,65	7,65	43,3	17,7
EEC 2	707384	8,04	8,04	49	16,4
EEC 3	837899	9,53	9,53	59,8	15,9
					Média 16,7

A capacidade antioxidante de um composto pode ser mensurada por meio de testes, que demonstrem a neutralização dos radicais livres presentes na amostra, dentre eles cita-se o teste de ABTS (2,2'-azino-bis(3- etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)), o teste de ORAC (oxigen radical absorbance capacity) e o DPPH (2,2 difenil-1-picrilhidrazil). Esse último consiste na descoloração de uma solução adicionada do radical livre DPPH, que se apresenta inicialmente na cor púrpura e ao ser convertido no DPPH não radical, torna-se de cor amarela, em virtude da atividade de doação de elétrons. O emprego dessa técnica fundamenta-se em razão do caráter simples, custo acessível e à eficiência do resultado obtido²¹.

Por conseguinte, no estudo em questão utilizou-se o teste do DPPH com comparação pelo antioxidante padrão: Trolox (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-ácido carboxílico) e a curva de dispersão encontra-se representada na Figura 3:

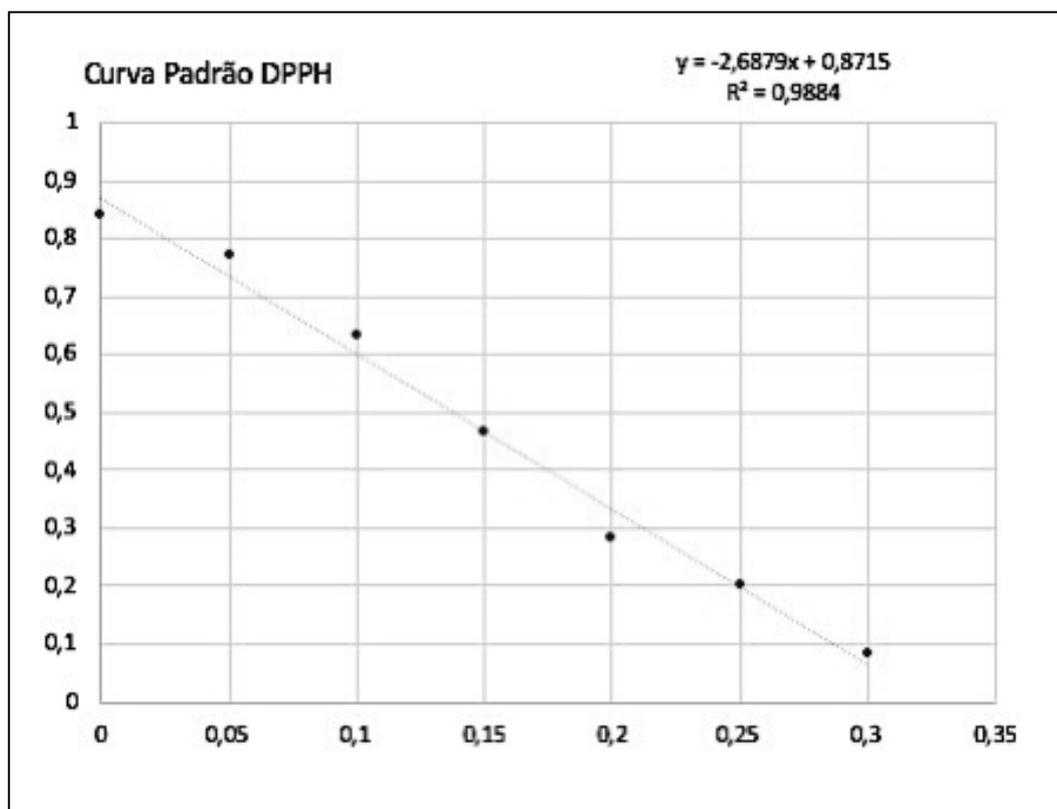


Figura 3 – Gráfico de dispersão entre a absorbância (eixo Y) e a concentração do padrão Trolox (eixo X).

Com a obtenção da equação, pôde-se estimar o poder antirradical do EEC por quantidade equivalente em Trolox (18,45) e também o IC_{50} , ou seja, o índice referente à concentração necessária para inibir a atividade do DPPH em 50% (Tabela 2)²¹.

O valor de IC_{50} encontrado no extrato pesquisado (18,10 $\mu\text{g/mL}$) corrobora com o valor descrito por Cericato *et al.* (17,28 \pm 0,44 $\mu\text{g/mL}$), que analisaram o extrato hidroalcolico da curcumina, obtido de rizomas cultivados no município de Maravilha, no oeste do estado de Santa Catarina, região de clima mesotérmico úmido, assim como o município de Mara Rosa - GO. Os resultados encontrados equiparam-se ao valor demonstrado no ácido ascórbico (16,48 \pm 0,11 $\mu\text{g/mL}$), cuja atividade antioxidante é bem estabelecida na literatura, ou seja, pode-se inferir que o EEC apresenta uma efetiva ação antioxidativa²².

Tabela 2 – Capacidade antioxidante em equivalente de padrão Trolox ($\mu\text{mol Trolox/mL}$) do extrato etanólico do açafrão de Mara Rosa.

DPPH	
Amostra	Extrato Etanólico da Curcumina
Abs 1	0,5
Abs 2	0,5
Abs 3	0,51
Média	0,502
Desvio Padrão	0,0035
Branco amostra	0,126
Branco solução	0,839
Abs branco	0,376
Concentração extrato (mg)	0,01
Atividade antioxidante ($\mu\text{M TROLOX/g amostra}$)	18,45
% Descoloração do DPPH	55
IC50 ($\mu\text{g/mL}$)	18,1

Carvalho e colaboradores (2015) também avaliaram o potencial antioxidativo da curcumina, porém utilizaram a molécula pura, adquirida comercialmente (Sigma Aldrich) e diluída em metanol, entretanto o resultado ($14.09 \pm 0.60 \mu\text{g/mL}$) foi um pouco mais efetivo que o obtido no EEC de Mara Rosa, dessa forma, pode-se deduzir que a utilização do metanol como solvente e a pureza da molécula influenciaram na reação antirradical²³.

Esses resultados mostram a importância de se caracterizar os componentes do EEC, haja vista que a comprovação qualitativa e quantitativa de antioxidantes no açafrão de Mara Rosa valida a perspectiva de sua utilização como protetor, em investigações *in vitro*, com tecidos submetidos ao estresse oxidativo.

4. CONCLUSÃO

O extrato etanólico feito com os rizomas do açafrão de Mara Rosa contém ácido gálico (691,49 mg/100g), curcumina (16,7%) e exerce atividade antioxidante.

REFERÊNCIAS

1. Prabhakaran Nair KP. The Agronomy and Economy of Turmeric and Ginger: the Invaluable Medicinal Spice Crops. London:Elsevier 2013:17-20p
2. Banik U, Parasuraman S, Adhikary AK, Orthman NH. Curcumin: the spicy modulator of breast carcinogenesis. Jour Exp Clin Cancer Res. 2017;36(1):98.
3. Marchi JP, Tedesco L, Melo AC, Frasson AC, França VF, Sato SW, Lovato ECW. Curcuma longa L., o açafrão da terra, e seus benefícios medicinais. Arq. Cienc. Saúde UNIPAR, Umuarama. 2016;20(3):189-194.
4. Dantas F. Identidade ao açafrão de Mara Rosa. Safra – Revista do Agronegócio, Goiânia, 20 de maio de 2016, Agricultura, pag 28-30. [Acesso 06 jul 2019]. Disponível em <http://revistasafra.com.br/acafrao-da-regiao-de-mara-rosa-go-e-o-primeiro-do-pais-com-indicacao-geografica/>
5. Kanungo S. Trend Analysis of Turmeric Exported from India and Associated Foreign Earnings. Int. J. Soc. Sci. Economic Res. 2016;6(11), November – 2016:99-105.
6. BRASIL. Serviço Nacional de Aprendizagem Rural. Notícias. Açafrão: ouro do Norte goiano. Notícias. 2018.
7. BRASIL. Ministério da Saúde; Portal da Saúde: Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos. 1a ed. Brasília: Editora MS, 135, 2009.
8. BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância de Doenças e Agravos não Transmissíveis e Promoção da Saúde. Saúde Brasil 2018 uma análise de situação de saúde e das doenças e agravos crônicos: desafios e perspectivas. 1ª ed. Brasília: Editora MS, 2019.
9. Yang Y, Duan W, Lin Y, Yi W, Liang Z, Yan J, Wang N, Deng C, Zhang S, Li Y, Chen W, Yu S, Yi D, Jin Z. Sirt1 activation by curcumin pretreatment attenuates mitochondrial oxidative damage induced by myocardial ischemia reperfusion injury. Free Radic. Biol. Med. 2013;65:667–79. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2013.07.007>
10. Péret-Almeida L, Naghetini CC, Nunan EA, Junqueira RG, Glória MBA. Atividade antimicrobiana *in vitro* do rizoma em pó, dos pigmentos curcuminóides e dos óleos essenciais da *Curcuma longa* L. Ciênc agrotec. 2008;32(3):875-81.
11. Waterhouse, A. L. Determination of total phenolics. Current protocols in food analytical chemistry, v. 1, p. 1-18, 2002.
12. Rufino MSM, Alves RE, Brito ES, Morais SM, Sampaio CG, Jimenez JP, Calixto FDS. Determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre DPPH. Comunicado Técnico Embrapa, 127:1-4, 2007.
13. Carvalho DM, Takeuchi KP, Geraldine RM, Moura CJ, Carneiro JES, Santos APM. Assessing Curcumin Solubility in Food-Grade Solvents. **Revista Processos Químicos**. 2015. 9. 23-26. 10.19142/rpq.v9i17.233.

14. Gao J, Hu J, Hu D, Yang X. A Role of Gallic Acid in Oxidative Damage Diseases: A Comprehensive Review. **Natural Product Communications**. v.14(8)1-9, 2019. Doi: <https://doi.org/10.1177/1934578X19874174>.
15. Santos IA, Silva, MV. Extratos hidroetanólicos de açafrão e páprica picante: fenólicos totais e capacidade antioxidante. In: III Simpósio de Alimentos e Nutrição. Rio de Janeiro, 2017.
16. Naksuriya O & Okonogi S. Comparison and combination effects on antioxidant power of curcumin with gallic acid, ascorbic acid, and xanthone. **Drug Discoveries & Therapeutics**. v9(2):136-141, 2015.
17. Kotha RR, Luthria DL. Curcumin: Biological, Pharmaceutical, Nutraceutical, and Analytical Aspects. **Molecules**. 2019 Aug 13;24(16). doi: 10.3390/molecules24162930.
18. Camatari FOS. Determinação de curcuminoides e avaliação da capacidade antioxidante contra espécies reativas de oxigênio e nitrogênio de extratos de curcuma longa e constituintes isolados. [Tese]. Maceió: Universidade Federal de Alagoas, Instituto de Química e Biotecnologia. 2017.
19. Akbar A, Kuanar A, Joshi RK, Sandeep IS, Mohanty S, Naik PK, Mishra A, Nayak S. Development of Prediction Model and Experimental Validation in Predicting the Curcumin Content of Turmeric (*Curcuma longa* L.). **Front Plant Sci**. v7;1507,2016. doi: 10.3389/fpls.2016.01507. PMID: 27766103; PMCID: PMC5053083.
20. Silva, NF, Sonnenberg PE, Borges JD. Crescimento e produção de cúrcuma (*Curcuma longa* L.) em função de adubação mineral e densidade de plantio. **Horticultura Brasileira**, v.22, n.1, p.61-65, 2004.
21. Fontes, SMS. *Cúrcuma longa* L.: caracterização química e estudo da capacidade antioxidante. [Dissertação]. Campinas: Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos. 2018.
22. Cericato A, Engel G, Tiburski Neto A, Sordi André, Lajus CR, Santos G. Avaliação Fitoquímica e Atividade Antioxidante de Açafrão (*Curcuma longa* L.), plantado em Sistema de Plantio Direto de Hortaliça. Fundação Agrisus - Agricultura Sustentável. 2017.
23. Carvalho DM, Takeuchi KP, Geraldine RM, Moura CJ, Carneiro JES, Torres MCL. Production, solubility and antioxidant activity of curcumin nanosuspension. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. Food Sci. Technol. Campinas. 2005,35(1):115-119.

**CAPÍTULO 4 – EFEITO PROTETOR DO EXTRATO ETANÓLICO DO AÇAFRÃO
(*CURCUMA LONGA* L.) DE MARA ROSA-GO SOBRE AS CÉLULAS ENDOTELIAIS
DE VEIA UMBILICAL HUMANA EM ESTRESSE OXIDATIVO**

RESUMO

Os compostos antioxidantes, provenientes da alimentação, podem contribuir no reparo das lesões celulares provocadas por acometimentos de origem vascular, como o acidente vascular encefálico (AVE) e os infartos. Sabe-se que os rizomas da cúrcuma ou açafrão (*Curcuma longa* L.) são bastante utilizados no Centro-Oeste do Brasil e em países da Ásia e eles têm demonstrado a presença de compostos como o ácido gálico e a curcumina (CUR) em concentrações significativas, além de alta capacidade de neutralizar radicais livres. Assim, objetivou-se com esse estudo avaliar o efeito do extrato etanólico da *Curcuma longa* L. (EEC) adquirida em Mara Rosa, município de Goiás, sobre as células endoteliais de veia umbilical humana (HUVEC), tanto em normoxia, como em estresse oxidativo (EO), além de analisar as possíveis expressões das vias de sinalização celular de caspase3, SIRT1 e mTOR. Testou o EEC em diferentes concentrações (0 µmol, 20 µmol, 50 µmol, 100 µmol e 1000 µmol), com exposição contínua a três diferentes períodos (24 h, 48 h, 72 h) em cultivos celulares de HUVEC, submetidas ou não ao estresse oxidativo, por meio de peróxido de hidrogênio a 1%. A viabilidade celular, a citotoxicidade e a concentração que inibe 50% da viabilidade celular (IC₅₀) foram obtidas a partir do método de redução do sal de tetrazólio (MTT). Posteriormente foi realizada a análise de imunocitoquímica para analisar a expressão das proteínas caspase3, SIRT1 e mTOR. Os resultados demonstraram que o EEC possivelmente amenizou a injúria celular por estresse oxidativo na dosagem de 100 µg/ml, por diminuição da imunexpressão de caspase3 e por promover a sinalização das rotas de sobrevivência SIRT1 e mTOR. Dessa forma, foi observado que o EEC apresentou efeito protetor.

Palavras-chaves: cúrcuma, SIRT1, citotoxicidade, peróxido de hidrogênio.

**CHAPTER 4 - PROTECTIVE EFFECT OF THE ETHANOLIC EXTRACT OF THE
SAFFRON (CURCUMA LONGA L.) FROM MARA ROSA-GO ON HUMAN
UMBILICAL VEIN ENDOTHELIAL CELLS IN OXIDATIVE STRESS**

ABSTRACT

Antioxidant compounds from food, can contribute to the repair cell injuries due of vascular disorders, such stroke and heart attack. It is known that saffron or turmeric rhizomes (*Curcuma longa* L.) are widely used in the Midwest of Brazil and in Asian countries and they have demonstrated the presence of compounds such as gallic acid and curcumin (CUR) in significant concentrations and high capacity to neutralize free radicals. Thus, the aim of this study was to evaluate the effect of the ethanol extract of *Curcuma longa* L. (EEC) acquired in Mara Rosa, municipality of Goiás, Brazil, on human umbilical vein endothelial cells (HUVEC), both in normoxia and in oxidative stress (OS), in addition to analyzing the possible activations of the cell signaling pathways from caspase3, SIRT1 and mTOR. We tested EEC at different concentrations (0 μmol , 20 μmol , 50 μmol , 100 μmol and 1000 μmol), with continuous exposure to three different periods (24 h, 48 h, 72 h) in HUVEC cell cultures subjected or not to stress oxidative, by means of 1% hydrogen peroxide. The cell viability, cytotoxicity and the concentration that inhibits 50% of cell viability (IC50) were obtained using the tetrazolium salt reduction method (MTT). Subsequently, an immunocytochemical analysis was performed to analyze the expression of the caspase3, SIRT1 and mTOR proteins. The results showed that the EEC possibly alleviated cell damage by oxidative stress at the dosage of 100 $\mu\text{g} / \text{ml}$, by decreasing the immunoexpression of caspase3 and by increasing the signaling of the SIRT1 survival route. Thus, the EEC showed a protective effect.

Keywords: turmeric, SIRT1, cytotoxicity, hydrogen peroxide.

1. INTRODUÇÃO

A mortalidade por acometimentos de origem vascular, como o acidente vascular encefálico (AVE) e os infartos têm aumentado de forma considerável. A interrupção do fluxo sanguíneo local, com a posterior reperfusão do oxigênio pode provocar efeitos deletérios e até danos irreparáveis nas células dos tecidos afetados. Isso ocorre devido ao estresse oxidativo (EO) que é gerado no ambiente celular^{1,2}.

Muitos estudos têm evidenciado que os compostos antioxidantes, provenientes da alimentação, podem contribuir no reparo das lesões celulares provocadas pelo EO. Nessa conjuntura, a cúrcuma ou açafrão (*Curcuma longa* L.) uma especiaria apreciada na culinária regional do Centro-Oeste do Brasil e em países da Ásia, tem demonstrado a presença de consideráveis substâncias ativas em seus rizomas. No extrato etanólico da cúrcuma já foram encontrados fenóis como o ácido gálico e a curcumina (CUR) em concentrações significativas, além de alta capacidade de neutralizar radicais livres. Ademais, reporta-se que a planta apresenta efeitos preventivo e terapêutico em diversas disfunções orgânicas, por atuar como antioxidante, antifúngico, anti-inflamatório, antibacteriano, antitumoral, antiviral, cicatrizante, hipoglicemiante, neuroprotetor, antiparasitário e imunomodulador^{3,4,5}.

Dentre os mecanismos moleculares envolvidos nos efeitos da CUR, existem evidências de que ela pode atuar nas vias de sinalização de SIRT1 (Sirtuínas do tipo 1), mTOR (proteína alvo da rapamicina em mamíferos) e na via da caspase3. Em estudos com animais submetidos ao AVE, percebeu-se que a curcumina apresentou efeito neuroprotetor, regulando a autofagia e a sobrevivência celular por meio da via de sinalização PI3K/Akt/mTOR^{6,7,8}.

Em outra pesquisa, demonstrou-se que as células endoteliais tanto em normoxia, quanto em EO, ao serem tratadas com CUR aumentaram a viabilidade pela via de SIRT1. Em acometimentos isquêmicos cardíaco, encefálico e renal, a CUR induziu a redução da morte celular, principalmente pela via das caspases^{8,9}.

A partir desses dados, objetivou-se com esse estudo avaliar o efeito protetor do extrato etanólico da *Curcuma longa* L. (EEC) adquirida em Mara Rosa, município de Goiás, sobre as células endoteliais de veia umbilical humana (HUVEC), tanto em normoxia, como em EO. Além disso, analisou-se a possível ativação das vias de sinalização celular de caspase3, SIRT1 e mTOR. Espera-se que o EEC possa representar uma alternativa economicamente viável de agente preventivo das injúrias provocadas pelo estresse oxidativo.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

A pesquisa foi conduzida no laboratório Multiusuário de Estudo de Moléculas, Células e Tecidos da Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás (LMAMCT/EVZ/UFG).

2.1. Células e cultura

As células endoteliais de veia umbilical humana – HUVEC (cedidas gentilmente pela Prof^a. Dr^a. Veridiana de Melo Rodrigues Ávila da Universidade Federal de Uberlândia/Minas Gerais/Brasil) foram originárias do banco de células da ATCC (American Type Culture Collection - Manassas, VA, USA). O cultivo foi feito em meio de cultura Dulbecco modificado de Eagle (DMEM) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), estreptomicina e penicilina (10.000 U.I./ml - 10 mg/ml), 1% de anfotericina B e L glutamina (Cultilab, Campinas, Brasil) e manutenção em incubadora com atmosfera de 5% de CO₂ e umidade de 37°C, de acordo com adaptação de Manea¹⁰.

Para o ensaio foram realizados três experimentos independentes em quintuplicata.

2.2. Obtenção do extrato etanólico da *Curcuma longa* L.

Os rizomas da *Curcuma longa* L. foram adquiridos na Cooperativa de Produtos do Açafrão de Mara Rosa (Cooperação) localizada no Município de Mara Rosa, estado de Goiás, Brasil.

Todas as etapas de obtenção do extrato bruto foram protegidas contra a fotodegradação. O processamento foi iniciado com a retirada dos rizomas da terra, seguido de lavagem e secagem em estufa para serem processados. Posteriormente, 100g do material seco e triturado foi adicionado a 1000 ml de etanol absoluto, que em seguida passou por percolação a frio. O sobrenadante foi filtrado e o solvente evaporado em rotoevaporador (IKA® RV 05 Basic)¹¹.

O EEC obtido foi diluído em meio de cultivo DMEM 1%, nas diferentes concentrações pré-estabelecidas, para sua administração nas células em cultivo, de acordo com a divisão do quadro 1.

QUADRO 1 – Delineamento experimental da diluição das concentrações do EEC de cada grupo utilizado para o tratamento das células endoteliais, nos tempos de exposição de 24 h, 48 h e 72 h.

Tratamento	Concentração do EEC	Meio de Cultivo
Grupo 1	0 µg/ml	DMEM 1%
Grupo 2	20 µg/ml	DMEM 1%
Grupo 3	50 µg/ml	DMEM 1%
Grupo 4	100 µg/ml	DMEM 1%
Grupo 5	1000 µg/ml	DMEM 1%

2.3. Avaliação do efeito do extrato etanólico da cúrcuma sobre as células endoteliais em normoxia

O cultivo das células HUVEC ocorreu em incubadora umidificada, a 37°C e atmosfera de 5% de CO₂, com concentração celular de 1x10⁴ células/poço em placas de cultivo de 96 poços. Após 24 horas do plaqueamento procedeu-se o tratamento com o EEC.

2.4. Ensaio de indução de estresse oxidativo

As HUVEC foram semeadas em placas de cultivo de 96 poços (1x10⁴ células/poço) e divididas aleatoriamente em grupos de tratamento com as diferentes concentrações de EEC. Após o período de tratamento as células foram submetidas ao estresse oxidativo, que foi induzido com o peróxido de hidrogênio a 1% (H₂O₂), diluído no meio de cultivo DMEM 1%, por seis horas consecutivas.

2.5. Ensaio de redução do sal de tetrazólio

Ao final do ensaio de indução de estresse oxidativo, descartou-se o conteúdo líquido de cada poço, para a adição de 10 µl de metil-tiazolil-tetrazólio (MTT). As placas foram incubadas por três horas e, em seguida, acrescentou-se em cada poço 50 µl de dodecil sulfato de sódio (SDS – Vivantis Biochemical) a 10% diluído em HCl (0,01N), para cessar a reação de MTT. As placas foram incubadas por 24 horas em temperatura ambiente e protegidas de luz.

A capacidade de absorvância do corante convertido, pelas células viáveis, foi medida em comprimentos de onda de 540 nm por meio de espectrofotômetro (Awareness Technology Ine[®]/Stat Fax 2100). O valor da absorvância resultante de cada poço foi calculado, segundo a fórmula computacional: absorvância (tratamento)/absorvância (controle)

× 100%, para se determinar a viabilidade celular. A partir dessa, calculou-se a citotoxicidade celular de cada poço, por meio da fórmula computacional: $100 - [\text{absorbância (tratamento)}/\text{absorbância (controle)} \times 100\%]$.

O valor da concentração de EEC que inibiu 50% da viabilidade celular (Inhibitory concentration – IC₅₀, em µmol) foi calculado pelo programa estatístico Graph Pad Prism 5 (Graph-Pad Software Inc., San Diego, CA, USA). As concentrações de menores citotoxicidades foram selecionadas para a análise imunocitoquímica.

2.6. Imunocitoquímica

Foi realizada a técnica de imunocitoquímica, por meio da utilização dos anticorpos primários anti-Caspase3 (polyclonal/coelho, SC7148, Santa Cruz Biotechnology, USA), anti-SIRT1 (monoclonal/camundongo, SC135792, Santa Cruz Biotechnology, USA), e phospho-mTOR (Ser2481, policlonal/camundongo, no. 2974, Cell Signaling Technology, Inc.), em diluições de 1:500. O controle negativo foi feito substituindo-se os anticorpos primários por BSA 3%. Todas as etapas da técnica foram executadas pelo processador automático de imunocitoquímica Bond-Max (Leica).

As lâminas marcadas com os anticorpos foram analisadas (de acordo com Fedchenko & Reifenrath)¹², a partir da contagem total de células em cada área imunocorada pelo DAB (cromógeno 3,3' diaminobenzidine tetrahydrochloride) e a porcentagem de células positivas (marcadas pelo anticorpo). As células imunocoradas parcial ou completamente em tons de castanho, foram consideradas positivas; as células imunomarcadas somente em tons de azul foram consideradas negativas. A relação de células coradas positivamente (RCCP) foi calculada pela razão entre o número de células marcadas e o número total de células, multiplicado por 100:

$$\text{RCCP} = \frac{\text{Número de células marcadas}}{\text{Número total de células}} \times 100$$

Com esse valor, atribuiu-se as categorias 0 para 0%; 1 para <1%; 2 para 1-10%, 3 para 11-33%, 4 para 34-66% e 5 para ≥67%. Para descrever a intensidade da expressão foi feita uma análise semiquantitativa, por três pesquisadores, com a utilização dos escores de 0 a 3, de acordo com o Quadro 2. Em seguida adotou-se o sistema de pontuação combinada semiquantitativa (SPCS), escore de Allred, que reuniu a porcentagem de células com a intensidade da coloração. As duas pontuações foram somadas para um valor final.

Quadro 2 – Tonalidades de referência da imunomarcção por cromógeno DAB para o estabelecimento dos escores atribuídos às diferentes expressões das proteínas pela análise da imunocitoquímica.

Marcação							
Escore	0	1	2	3			
	Nenhuma	Fraca	Intermediária	Forte			

3. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para normalizar os dados obtidos no ensaio de redução do sal de tetrazólio e remover possíveis outliers (valores atípicos), um modelo matemático foi empregado para que os valores superiores e inferiores a esses intervalos fossem retirados dos dados da quintuplicata. Em seguida por meio do pacote Easynova, foi realizada a análise de variância (ANOVA) e o teste *post hoc* de *t* (5% de significância) para comparar as médias de absorvância entre os grupos¹³.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados do ensaio de MTT mostraram que não houve diferença ($p < 0,05$) entre os três diferentes tempos de exposição, das HUVEC em normoxia, ao EEC (Tabela 1). Em 48 h, foi observada uma variação entre todas as concentrações de EEC utilizadas e o controle e esse mesmo resultado foi verificado na exposição celular ao composto por 72h. Hosseini e colaboradores notaram, por meio de ensaios de sobrevivência, que não ocorria queda na viabilidade das HUVECs expostas a curcumina pura até o tempo de 72 h, o que corrobora com os dados encontrados, haja vista que as maiores porcentagens de viabilidade celular encontradas neste trabalho, foram nas dosagens de 1000 $\mu\text{g/ml}$, tanto em 48 h (140,67%) e em 72 h (136,71%). Além disso, ao analisar estatisticamente todas as concentrações de EEC utilizadas, independente do tempo de exposição, foi visto que essa maior concentração ($p < 0,05$) se diferenciou estatisticamente do controle (Tabela 2)¹⁴.

Tabela 1 – Valores de viabilidade celular obtidos da absorvância por espectrofotometria para amostras de HUVEC em normoxia, após exposição contínua ao EEC por 24, 48 ou 72 horas.

TEMPO	TRATAMENTO	MÉDIA	DESVIO PADRÃO	%	TESTE T
24h A	Controle	0,035	0,001	100,00	a
	20 µg/ml	0,036	0,002	98,65	a
	50 µg/ml	0,035	0,001	96,80	a
	100 µg/ml	0,035	0,001	101,22	a
	1000 µg/ml	0,034	0,007	107,72	a
48h A	Controle	0,035	0,002	100,00	a
	20 µg/ml	0,035	0,002	99,51	b
	50 µg/ml	0,036	0,003	102,60	b
	100 µg/ml	0,035	0,002	98,85	b
	1000 µg/ml	0,049	0,008	140,67	b
72h A	Controle	0,035	0,001	100,00	a
	20 µg/ml	0,037	0,002	103,90	b
	50 µg/ml	0,035	0,002	98,46	b
	100 µg/ml	0,036	0,002	101,04	b
	1000 µg/ml	0,049	0,018	136,61	b

Legenda: HUVEC: Células endoteliais de veia umbilical humana; EEC (extrato etanólico da *Curcuma longa* L.); % (percentagem de viabilidade celular); letras maiúsculas indicam a diferença estatística entre os tempos de as exposição ao EEC e as minúsculas entre as concentrações utilizadas (teste de “t” $p < 0,05$).

Tabela 2 – Valores de viabilidade celular obtidos a partir da absorvância por espectrofotometria de amostras de HUVEC em normoxia, com as diferentes concentrações de EEC.

TRATAMENTO	MÉDIA DA ABSORBÂNCIA	TESTE T
Controle	0,035	b
20 µg/ml	0,035	b
50 µg/ml	0,035	b
100 µg/ml	0,035	b
1000 µg/ml	0,045	a

Legenda: HUVEC: Células endoteliais de veia umbilical humana; EEC (extrato etanólico da *Curcuma longa* L.); % (percentagem de viabilidade celular); letras minúsculas indicam a diferença estatística entre as concentrações utilizadas (teste de “t” $p < 0,05$).

Em relação à citotoxicidade, o teste demonstrou que em 24 h as concentrações de 20, 100 e 1000 µg/ml de EEC não se diferenciaram do controle. Já na dosagem de 50 µg/ml foi possível observar na Tabela 3, que houve uma variação ($p < 0,05$). Foi calculada a concentração inibitória 50% da população celular sob efeito do EEC, a qual apresentou o

índice de $IC_{50}=104,8 \mu\text{g/ml}$ em 24 h. Entretanto, na exposição à 48 e 72 h, esses valores elevaram-se para $IC_{50}=941,4$ e $IC_{50}=755,8 \mu\text{g/ml}$ respectivamente. Mohammad e colaboradores constataram, que a citotoxicidade do extrato hexânico de *Curcuma longa* L., era dose-dependente (0.28, 0.27 e 0.23 mg/ml, em 24, 48 e 72 h). Além disso, também observaram que em estudos que se utilizavam a curcumina pura, o valor de IC_{50} era significativamente menor em relação ao extrato do rizoma. Dessa forma, acredita-se que outras substâncias contidas no EEC, além da curcumina, puderam interferir no seu mecanismo de ação¹⁵.

Tabela 3 – Citotoxicidade de células endoteliais de veia umbilical humana, em condição de normoxia. Os valores foram obtidos no ensaio de redução do sal de tetrazólio.

TEMPO	TRATAMENTO	%	TESTE T
24h A	Controle	0,00	b
	20 $\mu\text{g/ml}$	1,35	b
	50 $\mu\text{g/ml}$	3,20	a
	100 $\mu\text{g/ml}$	-1,22	b
	1000 $\mu\text{g/ml}$	-7,72	b
48h B	Controle	0,00	a
	20 $\mu\text{g/ml}$	0,49	a
	50 $\mu\text{g/ml}$	-2,60	a
	100 $\mu\text{g/ml}$	1,15	a
	1000 $\mu\text{g/ml}$	-40,67	a
72h B	Controle	0,00	a
	20 $\mu\text{g/ml}$	-3,90	a
	50 $\mu\text{g/ml}$	1,54	a
	100 $\mu\text{g/ml}$	-1,04	a
	1000 $\mu\text{g/ml}$	-36,61	a

Legenda: EEC (extrato etanólico da *Curcuma longa* L.); % (percentagem de viabilidade celular); letras maiúsculas indicam a diferença estatística entre os tempos de as exposição ao EEC e as minúsculas entre as concentrações preparadas (teste de “t” $p<0,05$).

O efeito do EEC foi analisado também sobre as células HUVEC sob condição de estresse oxidativo (EO). Destarte, a análise estatística referente ao conjunto das variáveis tempo e concentração, mostrou que não houve nenhuma diferença ($p<0,05$) nem entre os três diferentes tempos de uso HUVEC, nem entre as concentrações utilizadas dentro dos referidos períodos de exposição (Tabela 4).

Tabela 4 – Ensaio de viabilidade celular pelo método de redução do sal de tetrazólio, em células endoteliais, submetidas ao estresse oxidativo (H₂O₂ à 1%). Análise das médias de absorvância em relação à concentração de EEC utilizada e os tempos de exposição (24h, 48h e 72h).

TEMPO	TRATAMENTO	MÉDIA	DESVIO PADRÃO	%	TESTE T
24h A	Controle	0,032	0,000	100,00	a
	20 µg/ml	0,033	0,000	103,45	a
	50 µg/ml	0,031	0,000	99,63	a
	100 µg/ml	0,033	0,001	104,43	a
	1000 µg/ml	0,032	0,000	101,59	a
48h A	Controle	0,032	0,000	100,00	a
	20 µg/ml	0,033	0,000	101,97	a
	50 µg/ml	0,032	0,000	99,65	a
	100 µg/ml	0,034	0,001	99,67	a
	1000 µg/ml	0,033	0,001	102,99	a
72h A	Controle	0,034	0,001	100,00	a
	20 µg/ml	0,034	0,001	99,58	a
	50 µg/ml	0,034	0,003	101,31	a
	100 µg/ml	0,036	0,002	104,49	a
	1000 µg/ml	0,035	0,003	103,37	a

Legenda: EEC (extrato etanólico da *Curcuma longa* L.); % (percentagem de viabilidade celular); letras maiúsculas indicam a diferença estatística entre os tempos de as exposição ao EEC e as minúsculas entre as concentrações utilizadas (teste de “t” p<0,05).

Porém, ao analisar estatisticamente somente as concentrações, foi constatado que dentre todas as concentrações de EEC utilizadas, a dosagem de 100 µg/ml apresentou-se significativamente diferente do controle (Tabela 5). A partir disso, pôde-se inferir que essa dose provocou uma reação protetora nas células perante a injúria de EO.

Tabela 5 – Valores de viabilidade celular obtidos com as diferentes concentrações de EEC, a partir da absorvância por espectrofotometria de amostras de HUVEC em estresse oxidativo.

TRATAMENTO	MÉDIA DA ABSORBÂNCIA	TESTE T
Controle	0.032	b
20 µg/ml	0.033	ab
50 µg/ml	0.032	b
100 µg/ml	0.034	a
1000 µg/ml	0.033	ab

Legenda: HUVEC: Células endoteliais de veia umbilical humana; EEC (extrato etanólico da *Curcuma longa* L.); % (percentagem de viabilidade celular); letras minúsculas indicam a diferença estatística entre as concentrações utilizadas (teste de “t” p<0,05).

Na análise de citotoxicidade do composto, em 24 e 48 h possivelmente não houve citotoxicidade, pois não foi demonstrada nenhuma diferença estatística, nem entre as dosagens empregadas, nem entre os tempos de exposição ao EEC. Já em 72 h, percebeu-se que no grupo de células expostas a 20 µg/ml de extrato variou estatisticamente do controle (Tabela 6). Em geral, percebeu-se que todas as doses empregadas estiveram numericamente semelhantes ou abaixo do valor do controle, o que pode ser deduzido que o EEC não é citotóxico.

Tabela 6 – Citotoxicidade celular apresentada pelas células endoteliais de veia umbilical humana, submetidas ao estresse oxidativo (H₂O₂ à 1%) e tratadas previamente com o extrato etanólico da *Curcuma longa* L. em diferentes concentrações e tempos de exposição.

TEMPO	TRATAMENTO	%	TESTE T
24h B	Controle	0	a
	20 µg/ml	-3,45	a
	50 µg/ml	0,37	a
	100 µg/ml	-4,43	a
	1000 µg/ml	-1,59	a
48h B	Controle	0	a
	20 µg/ml	-1,97	a
	50 µg/ml	0,35	a
	100 µg/ml	0,33	a
	1000 µg/ml	-2,99	a
72h A	Controle	0	b
	20 µg/ml	0,42	a
	50 µg/ml	-1,31	ab
	100 µg/ml	-4,49	ab
	1000 µg/ml	-3,37	ab

Legenda: % (percentagem de viabilidade celular); letras maiúsculas indicam a diferença estatística entre os tempos de as exposição ao extrato etanólico da *Curcuma longa* L. e as minúsculas entre as concentrações utilizadas (teste de “t” p<0,05).

A partir dos dados encontrados foram selecionadas as concentrações de 20, 50, 100 µg/ml e a exposição de 24 h para se investigar, através da técnica de imunocitoquímica, as possíveis vias de sinalização de sobrevivência (SIRT1) e morte celular (Caspase3, mTOR) nas HUVEC, tanto em normoxia, quanto em EO. Os resultados demonstraram a presença das vias citadas (Figuras 1 e 2).

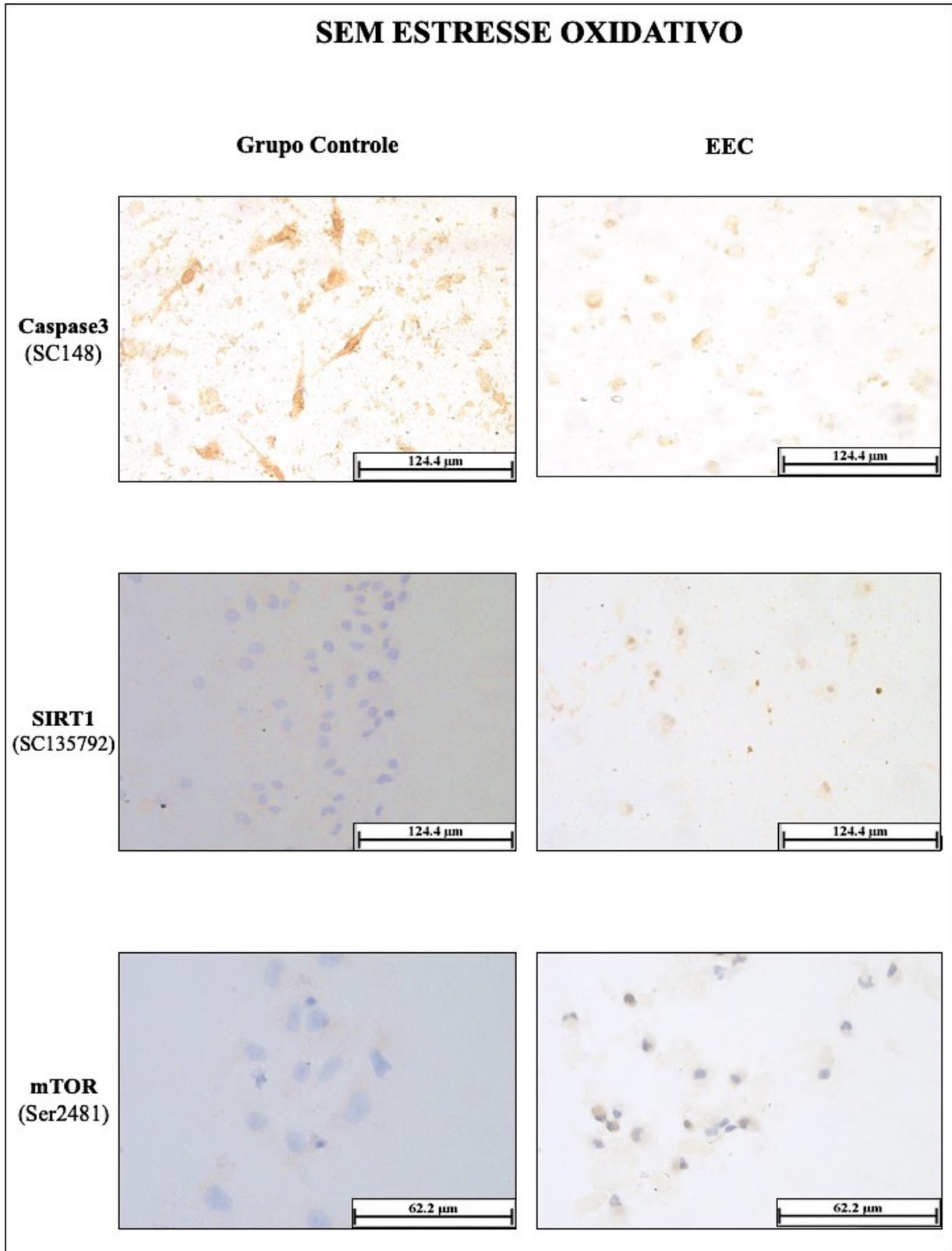


Figura 1 – Fotomicrografias de lâminas contendo células de endoteliais de veia umbilical humana, em ambiente de normoxia, após o ensaio de imunocitoquímica pelo processador automático Bond-Max (Leica). Notou-se que a intensidade de imunomarcagem pelo anticorpo caspase3 foi menor nas células tratadas com o extrato etanólico da *Curcuma longa* L. Com o anticorpo SIRT1 e mTOR visualizou-se uma maior marcação nas células expostas. Coloração: DAB, contra-coloração com hematoxilina.

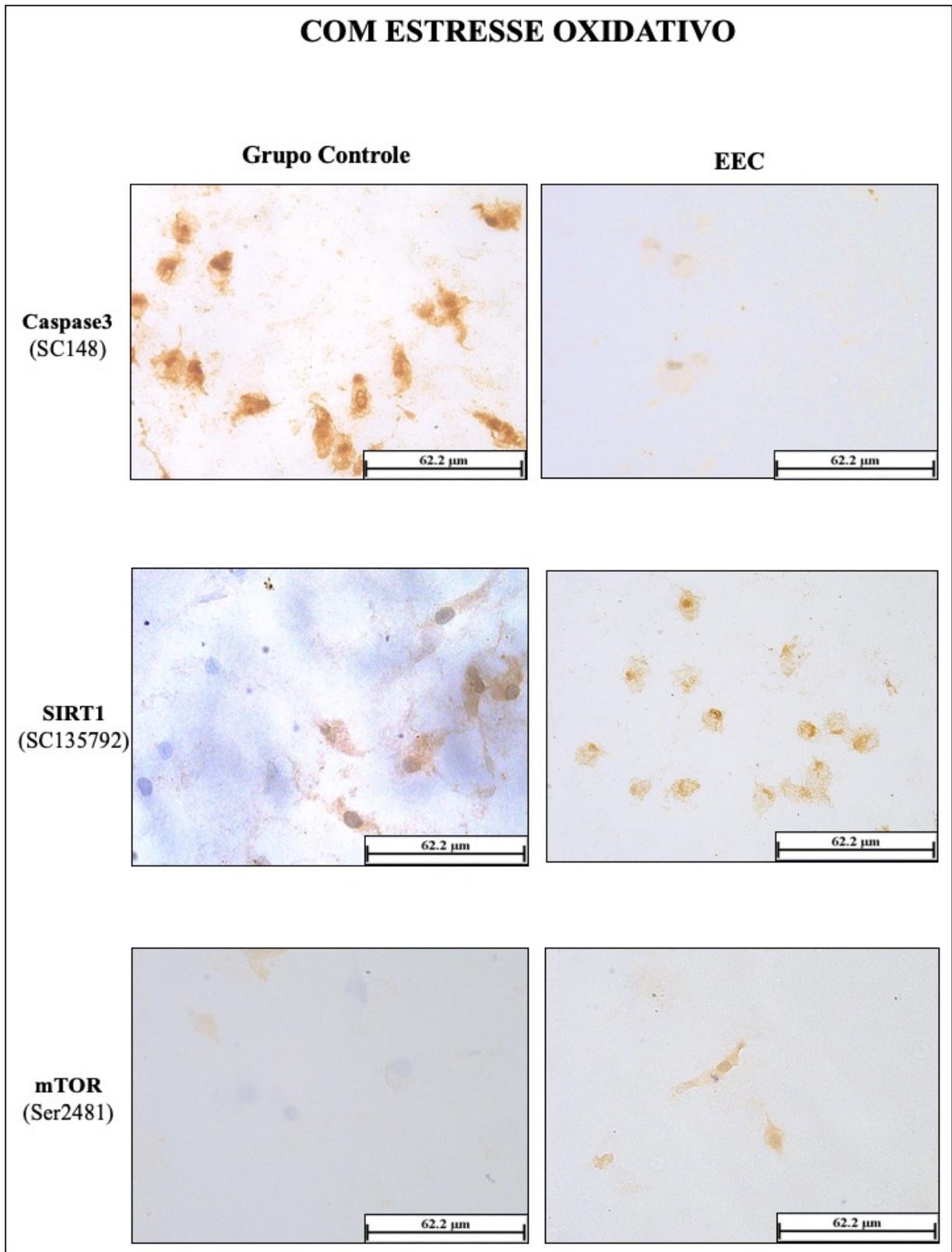


Figura 2 – Fotomicrografias de lâminas contendo células de endoteliais de veia umbilical humana, submetidas ao estresse oxidativo, após o ensaio de imunocitoquímica pelo processador automático Bond-Max (Leica). A reação de imunomarcção de caspase3 diminuiu acentuadamente nas células expostas ao extrato etanólico da *Curcuma longa* L em relação ao controle. O inverso foi observado com a utilização dos anticorpos SIRT1 e mTOR, em

que a imunomarcaco nos grupos controle foram menores em relao ao tratamento com o extrato. Colorao: DAB, contra-colorao com hematoxilina.

Pela análise morfológica foram notadas alteraes entre as células do controle e as tratadas com CUR. As HUVEC expostas  baixas dosagens de CUR demonstraram aumento do número de células em cultura (figuras de mitose) e as características originárias foram mantidas como crescimento em monocamada, formato poligonal, núcleo centralizado e bordas preservadas. Em maiores concentraes, tanto em normoxia, quanto em EO pôde ser visto algumas dismorfias como projees citoplasmáticas irregulares e cromatina grosseira, além disso houve perda de adesão celular e diminuio no número de células.

Por meio da classificao de Allred foi possível observar, na Tabela 7, que em normoxia, a magnitude da imunomarcaco de caspase3, um marcador de morte celular, reduziu-se gradativamente com o aumento da concentrao de EEC, podendo-se deduzir que o mesmo promoveu uma proteo celular, já que concomitante percebeu-se a expressão de SIRT1 nas células que receberam o extrato, diferentemente do controle. A SIRT1  uma proteína relacionada ao metabolismo e  sobrevivência celular e a sua relevância na vasculatura se d em razão de sua expressão estar associada  proteo do endotélio contra a senescência, a disfuno além da promoo do reparo ao DNA^{16,17}.

Tabela 7 – Escore de Allred para a avaliao das imunomarcaces em células endoteliais de veia umbilical humana, em condies de normoxia.

ANTICORPO	CONCENTRAO	CATEGORIA	ESCORE	SPCS
Caspase3	Controle	5	2	7
	20 µg/ml	5	3	8
	50 µg/ml	5	2	7
	100 µg/ml	5	1	6
SIRT1	Controle	0	0	0
	20 µg/ml	5	1	6
	50 µg/ml	5	1	6
	100 µg/ml	5	1	6
mTOR	Controle	3	1	4
	20 µg/ml	5	1	6
	50 µg/ml	5	1	6
	100 µg/ml	5	1	6

SPCS: sistema de pontuao combinada semiquantitativa.

Sabe-se que em células sob estresse oxidativo tem-se a ativao de cascatas de sinalizao MAPK, que resultam em estimulao da caspase3 e, conseqüentemente, a apoptose. Nas HUVEC sob estresse oxidativo, do presente estudo, o menor grau de marcao

dessa proteína foi visualizado na concentração de 50 µg/ml de EEC (Tabela 8). O estudo de Han e colaboradores apresentou a redução da atividade de caspase3 e caspase-9 em células endoteliais tratadas com curcumina pura, na concentração de 10 µg/ml. Esses achados corroboram com a literatura que tem mostrado que a curcumina pode amenizar a morte celular em concentrações mais baixas, uma vez que as dosagens altas têm sido sugeridas para induzir a apoptose de células neoplásicas^{18,19}.

Tabela 8 – Escore de Allred para a avaliação das imunomarcações em células endoteliais de veia umbilical humana, em condições de estresse oxidativo.

ANTICORPO	CONCENTRAÇÃO	CATEGORIA	ESCORE	SPCS
Caspase3	Controle	5	2	7
	20 µg/ml	5	2	7
	50 µg/ml	2	2	4
	100 µg/ml	5	3	8
SIRT 1	Controle	4	3	7
	20 µg/ml	5	2	7
	50 µg/ml	5	2	7
	100 µg/ml	5	3	8
mTOR	Controle	0	0	0
	20 µg/ml	3	1	4
	50 µg/ml	5	2	7
	100 µg/ml	5	2	7

Em relação a proteína de sobrevivência celular, os estudos têm evidenciado que os compostos fenólicos como o resveratrol e os curcuminoides atenuam as injúrias celulares provocadas pelo EO, por meio do aumento da expressão da SIRT1. Assim, os dados deste estudo mostraram que o pré-tratamento com o EEC elevou a expressão de SIRT1 nas HUVEC, expostas ao H₂O₂, provavelmente de modo dose-dependente, já que em 100 µg/ml a imunomarcação foi maior que as demais. Esse resultado vai ao encontro dos achados de Sun e colaboradores, que ao investigarem a senescência de HUVEC, por meio da exposição de H₂O₂, observaram a imunomarcação de SIRT1 ao tratarem as células com curcumina pura. Xiao e colaboradores também visualizaram esse aumento da proteína em células miocárdicas submetidas ao estresse oxidativo, e explicaram que os efeitos protetores da curcumina foram atribuídos à ativação do SIRT1, sugerindo o agente como uma terapia futura^{8,17}.

A ativação da proteína mTOR, proteína alvo da rapamicina em mamíferos, está associada a eventos de injúria celular e também carcinogênese. Alguns estudos sugeriram que a curcumina atua na regulação do mTOR, principalmente pela via AMPK/mTOR ou

PI3K/AKT/mTOR, desempenhando citoproteção e manutenção das funções celulares essenciais^{20,21}.

No presente estudo, a marcação dessa proteína esteve mais intensa nas células tratadas com o EEC e de forma dose-dependente, tanto nas HUVEC em normoxia, quanto em EO, sugerindo citoproteção por essa via. Esse achado corrobora com a literatura, que citou melhor viabilidade celular por aumento da expressão mTOR, em células endoteliais expostas ao H₂O₂ e pré-tratadas com curcumina pura (5 e 20 µg/ml)^{15,21}.

Ressalta-se que os resultados encontrados na literatura são de experimentos em que se utilizaram a curcumina pura adquirida comercialmente, portanto é necessário separar e analisar mais constituintes do EEC, para elucidar a presença de outros compostos e também as outras possíveis rotas de ativação de proteínas sinalizadoras¹⁵.

5. CONCLUSÃO

O extrato etanólico da *Curcuma longa* L. amenizou a injúria celular por estresse oxidativo na dosagem de 100 µg/ml, por diminuição da imunoexpressão de caspase3 e pelo aumento da sinalização da rota de sobrevivência SIRT1.

REFERENCIAS

1. BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância de Doenças e Agravos não Transmissíveis e Promoção da Saúde. Saúde Brasil 2018 uma análise de situação de saúde e das doenças e agravos crônicos: desafios e perspectivas. 1ª ed. Brasília: Editora MS, 2019.
2. Soares GP, Klein CH, Silva NAS, Oliveira GMM. Evolução da Mortalidade por Doenças do Aparelho Circulatório nos Municípios do Estado do Rio de Janeiro, de 1979 a 2010. Arquivos Brasileiros de Cardiologia [Internet]. 2015; 104:[356–65 pp.].
3. Kalogeris T, Baines CP, Krenz M, Korthuis RJ. Ischemia/Reperfusion. Comprehensive Physiology. 2016;7:113–70.
4. Karłowicz-Bodalska K, Han S, Freier J, Smolenski M, Bodalska A. Curcuma longa as medicinal herb in the treatment of diabetic complications. Acta Pol Pharm. v74(2):605-610, 2017.
5. Aggarwal BB, Deb L, Prasad S. Curcumin Differs from Tetrahydrocurcumin for Molecular Targets, Signaling Pathways and Cellular Responses. Molecules 2015, 20(1), 185-205; <https://doi.org/10.3390/molecules20010185>

6. Li W, Suwanwela NC, Patumraj S. Curcumin prevents reperfusion injury following ischemic stroke in rats via inhibition of NF- κ B, ICAM-1, MMP-9 and caspase3 expression. *Molecular Medicine Reports*. 2017;16:4710-20. DOI: 10.3892/mmr.2017.7205
7. Han J, Pan XY, Xu Y, Xiao Y, An Y, Tie L, Pan Y, Li XJ. Curcumin induces autophagy to protect vascular endothelial cell survival from oxidative stress damage. *Autophagy*. 2012;8(5):812-25. DOI: 10.4161/auto.19471.
8. Sun Y, Hu X, Hu G, Xu C, Jiang H. Curcumin Attenuates Hydrogen Peroxide-Induced Premature Senescence via the Activation of SIRT1 in Human Umbilical Vein Endothelial Cells. *Biol Pharm Bull*. 2015;38(8):1134-41. doi: 10.1248/bpb.b15-00012.
9. Yang Y, Duan W, Lin Y, Yi W, Liang Z, Yan J, Wang N, Deng C, Zhang S, Li Y, Chen W, Yu S, Yi D, Jin Z. Sirt1 activation by curcumin pretreatment attenuates mitochondrial oxidative damage induced by myocardial ischemia reperfusion injury. *Free Radic. Biol. Med*. 2013;65:667–79. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2013.07.007>
10. Manea SA, Fenyó IM, Manea A. c-Src tyrosine kinase mediates high glucose-induced endothelin-1 expression. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 2016;123–130.
11. Péret-Almeida L, Naghetini CC, Nunan EA, Junqueira RG, Glória MBA. Atividade antimicrobiana *in vitro* do rizoma em pó, dos pigmentos curcuminóides e dos óleos essenciais da *Curcuma longa* L. *Ciênc agrotec*. 2008;32(3):875-81.
12. Fedchenko, Nickolay & Reifenrath, Janin. Different approaches for interpretation and reporting of immunohistochemistry analysis results in the bone tissue – a review. *Diagnostic Pathology*. 2014;9:221. DOI: 10.1186/s13000-014-0221-9.
13. Arnhold E. Package in the R-environment for analysis of variance and complementary analyses. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science* 2013;50(6):488-92. DOI: 10.11606/issn.1678-4456.v50i6p488-492.
14. Hosseini A, Rasmi Y, Rahbarghazi R, Aramwit P, Daeihassani B, Saboory E. Curcumin modulates the angiogenic potential of human endothelial cells via FAK/P-38 MAPK signaling pathway. *Gene*, 2019;688:7-12.
15. Mohammad PM, Nosratollah Z, Mohammad RY, Abbas A, Javad R. The inhibitory effect of *Curcuma longa* extract on telomerase activity in A549 lung cancer cell line. *African Journal of Biotechnology*. 2010;9:912-919. DOI:10.5897/AJB09.904.
16. Jia G, Aroor A, Jia C, Sowers J. Endothelial cell senescence in aging-related vascular dysfunction. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*. 2019,1865(7):1802-09. DOI: 10.1016/j.bbadis.2018.08.008.
17. Xiao, X. Sheng, X. Zhang, M. Guo, X. Ji. Curcumin protects against myocardial infarction-induced cardiac fibrosis via sirt1 activation in vivo and in vitro. *Drug Des. Dev. Ther*. 2016;10:1267–77. DOI: 10.2147/DDDT.S104925

18. Yang B, Yin C, Zhou Y, Wang Q, Jiang Y, Bai Y, Qian H, Xing G, Wang S, Li F, Feng Y, Zhang Y, Cai J, Aschner M, Lu R. Curcumin protects against methylmercury-induced cytotoxicity in primary rat astrocytes by activating the Nrf2/ARE pathway independently of PKC δ . *Toxicology*. 2019;425,152248. DOI:<https://doi.org/10.1016/j.tox.2019.152248>
19. Piantino CB, Salvadori FA, Ayres PP, Kato RB, Srougi V, Leite KR, Srougi M. An evaluation of the anti-neoplastic activity of curcumin in prostate cancer cell lines. *Int. Braz J Urol*. 2009;35(3):354-361. <http://dx.doi.org/10.1590/S1677-55382009000300012>.
20. Huang L, Chen C, Zhang X, Li X, Chen Z, Yang C, Liang X, Zhu G, Xu Z. Neuroprotective Effect of Curcumin Against Cerebral Ischemia-Reperfusion Via Mediating Autophagy and Inflammation. *J Mol Neurosci*. 2018; 64(1):129-139. Doi:10.1007/s12031-017-1006-x.
21. Guo S, Long M, Li X, Zhu S, Zhang M, Yang Z. Curcumin activates autophagy and attenuates oxidative damage in EA.hy926 cells via the Akt/mTOR pathway. *Molecular Medicine Reports*, 2016;13:2187-2193. DOI://doi.org/10.3892/mmr.2016.4796

CAPÍTULO 5 – CONSIDERAÇÕES FINAIS

O aumento dos índices de mortalidade por doenças crônicas do sistema circulatório tem impactado a população e gerado uma preocupação em obter tanto para si, quanto para seus animais de estimação, alimentos mais saudáveis, naturais, nutritivos e com comprovação científica de seus benefícios, dentre eles, cita-se os antioxidantes.

O açafrão (*Curcuma Longa L.*) é uma planta utilizada há séculos pela população do mundo todo, mas foi percebido um aumento no interesse por essa planta, a cada comprovação científica de seus efeitos terapêuticos. A curcumina é o seu principal composto, que apresenta efetiva atividade antioxidante.

Por meio do uso da curcumina sintética, verificou-se que nas células endoteliais de veia umbilica humana (HUVEC) em normoxia, o tratamento de 24 h com a curcumina apresentou efeito protetivo em todas as concentrações utilizadas (20 μmol , 50 μmol , 100 μmol , 1000 μmol). Em 48 h, essa proteção apresentou um padrão diferente a partir 50 μmol da molécula. E em 72 h o efeito protetivo diminuiu para 20 μmol .

No presente estudo, avaliou-se o extrato etanólico da curcumina proveniente do açafrão (*Curcuma longa L.*) de Mara Rosa/GO, o qual demonstrou capacidade antioxidante por meio da presença do ácido gálico, da curcumina e de atividade antioxidante em DPPH. Posteriormente, testou-se esse composto em HUVEC tanto em normoxia, quanto sob EO e demonstrou-se, nas condições desse experimento, que o extrato etanólico da *Curcuma longa L.* possivelmente amenizou a injúria celular do estresse oxidativo na concentração de 100 $\mu\text{g/ml}$, com uma diminuição da imunexpressão de caspase3 e aumento da sinalização da rota de sobrevivência SIRT1.

Dessa forma, percebeu-se que o açafrão de Mara Rosa pode apresentar uma importância para além do fator econômico, mas como também um promotor da saúde. Espera-se que as pesquisas futuras revelem mais informações sobre os demais componentes dos rizomas e a possibilidade de sua utilização clínica, de forma eficaz e segura.