



# **Universidade Estadual de Maringá**

Centro de Ciências de Biológicas  
Área de concentração Biologia Celular e Molecular  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas

---

EMANUELE PARREIRA DE LIMA

**ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA E ANTIOXIDANTE DE  
CURCUMINÓIDES ENCAPSULADOS EM NANOPARTÍCULAS DE  
POLI(VINIL PIRROLIDONA) EM MODELO EXPERIMENTAL DE  
INFLAMAÇÃO CUTÂNEA**

Maringá  
2019

EMANUELE PARREIRA DE LIMA

**ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA E ANTIOXIDANTE DE  
CURCUMINÓIDES ENCAPSULADOS EM NANOPARTÍCULAS DE POLI  
(VINIL PIRROLIDONA) EM MODELO EXPERIMENTAL DE INFLAMAÇÃO  
CUTÂNEA**

Dissertação apresentada ao Programa de  
Pós-Graduação em Ciências Biológicas  
(área de concentração – Biologia Celular e  
Molecular) da Universidade Estadual de  
Maringá-UEM.

Orientadora: Prof. Dra. Ciomar A. Bersani Amado

Co-Orientador: Prof. Dr. Odinei Hess Gonçalves

Maringá  
2019

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**  
**(Biblioteca Central - UEM, Maringá, PR, Brasil)**

L732a Lima, Emanuele Parreira de  
Atividade anti-inflamatória e antioxidante de curcuminóides encapsulados em nanopartículas de poli (vinil pirrolidona) em modelo experimental de inflamação cutânea / Emanuele Parreira de Lima. -- Maringá, 2019.  
39 f. : il. (algumas color.).

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ciomar A. Bersani Amado.  
Coorientador: Prof. Dr. Odinei Hess Gonçalves.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências de Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, 2019.

1. Curcuminóides - Nanoencapsulação. 2. Curcuminóides - Tratamento - Inflamação cutânea. 3. Curcuminóides - Uso terapêutico. I. Amado, Ciomar A. Bersani, orient. II. Gonçalves, Odinei Hess, coorient. III. Universidade Estadual de Maringá. Centro de Ciências de Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas. IV. Título.

CDD 23.ed. 615.32439

Síntique Raquel de C. Eleuterio - CRB 9/1641

## **Bibliografia**

Emanuele Parreira de Lima nasceu em Tapira/PR em 10/07/1995. Possui graduação em Bioquímica pela Universidade Estadual de Maringá (2016). Atualmente é mestranda no programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Maringá. Tem experiência na área de Biologia Celular e Bioquímica, atuando principalmente nos seguintes temas: Enzimas, microrganismos e inflamação.

## **Dedicatória**

Dedico este trabalho a meus pais, José Jaime de Lima e Nardeti Parreira de Lima e irmãos Gabriel Parreira de Lima e Rodrigo Rener Parreira de Lima, por terem sonhado esse sonho junto comigo, por todo incentivo e esforço para que eu chegasse até aqui.

## Agradecimentos

Com essa dissertação concluo mais um passo rumo a um sonho que não sonhei sozinha. Um sonho que por vezes pareceu distante, mas que hoje está cada vez mais próximo.

A Deus, por em sua infinita misericórdia ter conduzido meus passos, auxiliado nas minhas decisões, colocado em minha vida pessoas abençoadas e cheias de luz, que me auxiliaram na caminhada até aqui.

Aos meus pais, José Jaime e Nardeti Parreira de Lima, por me indicarem o melhor caminho a seguir, por me amarem e me incentivarem, por fazer o possível e o impossível para que eu chegasse até aqui. Essa vitória é para vocês, é sempre para vocês.

Aos meus avós José Emanuel Parreira (*in memoriam*), Jeinil Magrinelli Parreira (*in memoriam*) e Santana Sidneis de Lima, por me amarem e acreditarem sempre em mim.

Aos meus irmãos, Gabriel e Rodrigo, meus parceiros de vida, que entre tapas e beijos sempre me amaram e me apoiaram e foram minha inspiração para chegar até aqui.

Ao meu namorado, Danilo Kenji, por caminhar comigo nos últimos anos, por ser paciente e compreensivo, por me auxiliar nos dias difíceis, por não me deixar desanimar e por cuidar tão bem de mim. Sou muito grata a Deus por ter colocado alguém tão maravilhoso em minha vida, alguém que me dá suporte e me impulsiona rumo a meu sonho.

Das muitas pessoas que passaram pelo meu caminho algumas escolheram ficar e a elas a minha gratidão. Gratidão porque vocês vivem comigo dias bons e de festa, mas também os dias ruins. Gratidão por que em meio a um mundo cada vez mais egoísta vocês se solidarizaram comigo e caminharam ao meu lado. Obrigada meus amigos Luana Tomaz, Amanda Aguielo, Jaqueline Malvezzi, Lidiane Furlan, Tainá Ariozi Gabriela Almeida, Alex Montilha, Jefersson Lucas, Rogério Mendonça, entre tantos outros amigos de muitos anos, que acompanharam a caminhada desde o início. Outros que entraram nos meus caminhos mais recentemente, mas são tão importantes quanto, amigos de curso, amigos que nasceram pela fé, amigos que vieram com o namorado, a todos vocês minha eterna gratidão.

À minha orientadora Dra. Ciomar Aparecida Bersani Amado, por ter me acolhido tão bem e por ter me ensinado muito, tanto no quesito profissional como pessoal. Agradeço a oportunidade e o aprendizado.

Ao meu co-orientador Odinei Hess Gonçalves e a toda sua equipe do Laboratório de Tecnologia de Alimentos da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, em especial ao Cristhian Rafael Lopes. Ao Departamento de Física da Universidade Estadual de Maringá, em especial à Professora Francielle Sato e à aluna Lidiane Vizioli de Castro. Ao Laboratório de Metabolismo Hepático, em especial ao Professor Jurandir Fernando Comar e a aluna Aline Francieli da Silva.

Aos meus amigos, colegas, técnicos e demais professores do laboratório. Obrigada por todo ensinamento, ajuda e tempo de convivência compartilhado. Especialmente à Franciele Queiroz Ames, Bruno Ambrósio da Rocha, Larissa Lauer Schneider, Gabriel Cardia, Ane Caroline Dagues, João Marcos Parolo, Mariana Pedrozo, Hugo Zerbinati, Giovana Alvez, Jailson Araújo Dantas, Célia Regina Miranda, Professora Doutora Silvana Martins Caparroz Assef, Professor Doutor Roberto Kenji Nakamura Cuman e Professora Doutora Francielli Maria de Souza Silva Comar.

E por fim, aos demais colegas e professores que de alguma forma contribuíram para a realização do meu mestrado. Muito obrigada!

## RESUMO

A *Cúrcuma longa L.*, popularmente conhecida como açafrão tem sua origem no Oriente Médio, e se distribui mundialmente, se destacando tanto por suas propriedades alimentícias como também por suas atividades biológicas. Em especial, a atividade anti-inflamatória e antioxidante desta fécula deve-se a um grupo de pigmentos chamados curcuminóides, compostos por curcumina, dimetoxicurcumina, bis-dimetoxicurcumina e ciclocurcumina, sendo a curcumina, o componente principal e mais estudado deste grupo. O uso terapêutico dos curcuminóides é limitado devido à sua baixa solubilidade em água e baixa biodisponibilidade quando administrada por via oral. Assim, tem sido empregadas estratégias com o objetivo de melhorar a solubilidade e, por conseguinte, a biodisponibilidade dos curcuminóides, dentre elas a utilização de adjuvantes, encapsulação em nano e micropartículas, associação com lipossomas, com micelas, entre outras. No entanto, a literatura mostra que poucos estudos foram realizados para avaliar o efeito dos curcuminóides, seja na forma livre ou encapsulada, sobre a inflamação cutânea. Assim, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a eficácia anti-inflamatória e antioxidante das nanopartículas de poli(vinil pirrolidona) contendo curcuminóides naturais da cúrcuma, extraídos diretamente da raiz da planta (Nano-cur), comparativamente aos curcuminóides livres (não encapsulados, Cur) sobre a inflamação cutânea induzida pelo óleo de crotón. Para isto os animais foram divididos em dois grupos experimentais: (1) tratados por via tópica com Cur e Nano-cur nas doses de 0,5; 0,25; 0,125; 0,0625 e 0,03125 mg/orelha e, (2) tratados por via oral com Cur nas doses de 400, 200 e 100 mg/kg e Nano-cur nas doses de 50,0; 25,0 e 12,5 mg/kg. Imediatamente após o aplicação tópica ou uma hora após o tratamento por via oral, foi induzido o processo inflamatório pela aplicação tópica do OC na orelha esquerda dos animais. A orelha direita recebeu o mesmo volume de veículo (acetona 70%), sendo considerada controle não inflamado. Após seis horas, os animais foram anestesiados, sacrificados e o tecido da orelha foi coletado para avaliação do edema, da MPO e do estresse oxidativo, avaliando o conteúdo de proteínas carboniladas, glutathiona reduzida (GSH) e espécies reativas de oxigênio (ROS) e a atividade da catalase. Também foi utilizada a técnica de espectroscopia fotoacústica (PAS) para determinar a permeação percutânea da Cur e da Nano-cur. Os resultados demonstraram que a aplicação tópica de OC provocou intensa formação de edema associado ao aumento do recrutamento de

células inflamatórias (MPO). Os Cur, quando administrados por via tópica, foram tão efetivos quanto os Nano-cur em inibir a formação do edema de orelha e a atividade da MPO. Ambas as preparações (Cur e Nano-cur) aplicadas topicamente permearam no tecido de maneira similar, como evidenciado pela técnica de PAS. No entanto, quando administrados por via oral, os Nano-cur foram efetivos em dose oito vezes menor que os Cur sobre a formação do edema, e em dose quatro vezes menor sobre a atividade da MPO. A aplicação de OC causou um aumento no estresse oxidativo, caracterizado por um aumento no conteúdo de espécies reativas de oxigênio (*reactive oxygen species* - ROS) e proteínas carboniladas, associados a uma diminuição nos níveis de glutathione reduzida (GSH) e da atividade da catalase. O tratamento com Cur e Nano-cur, tanto por via tópica como oral, modificaram os marcadores do estresse oxidativo, prevenindo a produção de ROS e de proteínas carboniladas e a diminuição dos níveis de GSH. No conjunto, os dados mostraram que as preparações de Cur e Nano-cur, quando administradas na mesma dose, por via tópica, inibiram, de modo similar, a resposta inflamatória e oxidativa (via redução do edema, da atividade da MPO, e da produção de ROS, e aumento de agentes antioxidantes como GSH). Por outro lado, quando as preparações foram administradas por via oral, a Nano-cur inibiu a formação do edema em dose oito vezes menor que a Cur, sugerindo uma melhor biodisponibilidade da Nano-cur quando comparada a Cur.

**Palavras Chave:** curcuminóides, inflamação, estresse oxidativo, permeação percutânea, nanoencapsulação.

## GENERAL ABSTRACT

Turmeric Long L, popularly known as turmeric has its origins in the Middle East, and is distributed worldwide, standing out both for its food properties as well as for its biological activities. In particular, the anti-inflammatory and antioxidant activity of this starch is due to a group of pigments called curcuminoids, composed of curcumin, dimethoxycurcumin, bis-dimethoxycurcumin and cyclocurcumin, curcumin being the main and most studied component of this group. The therapeutic use of curcuminoids is limited due to their low solubility in water and low bioavailability when administered orally. Thus, strategies have been employed with the aim of improving the solubility and, therefore, the bioavailability of curcuminoids, among them the use of adjuvants, encapsulation in nano and microparticles, association with liposomes, micelles, among others. However, the literature shows that few studies have been conducted to evaluate the effect of curcuminoids, either in free or encapsulated form, on skin inflammation. The aim of the present study was to evaluate the anti-inflammatory and antioxidant efficacy of the polyoxyglycerol nanoparticles containing natural curcumin curcuminoids extracted directly from the plant root (Nano-cur), compared to free curcuminoids (non-encapsulated, Cur) on skin inflammation induced by croton oil. For this, the animals were divided into two experimental groups: (1) treated topically with Cur and Nano-cur at doses of 0.5; 0.25; 0.125; 0.0625 and 0.03125 mg / ear and, (2) orally treated with Cur at doses of 400, 200 and 100 mg / kg and Nano-cur at doses of 50.0; 25.0 and 12.5 mg / kg. Immediately after the topical application or one hour after the oral treatment, the inflammatory process was induced by the topical application of OC in the left ear of the animals. The right ear received the same volume of vehicle (acetone 70%), being considered non-inflamed control. After six hours, the animals were anesthetized, sacrificed and the ear tissue was collected for edema, MPO and oxidative stress evaluation and also the content of carbonylated proteins, reduced glutathione (GSH) and reactive oxygen species (ROS) and the catalase activity were analyzed. The technique of photoacoustic spectroscopy (PAS) was also adopted to determine the percutaneous permeation of Cur and Nano-cur. The results demonstrated that the topical application of OC caused intense edema formation associated with increased inflammatory cell recruitment

(MPO). Cur, when administered topically, was as effective as Nano-cur in inhibiting the formation of ear edema and MPO activity. Both preparations (Cur and Nano-cur) applied topically permeated into the tissue in a similar manner, as evidenced by the PAS technique. However, when administered orally, Nano-cur were effective at a dose eight times lower than Cur on edema formation, and at a dose four times lower on MPO activity. The application of OC caused an increase in the oxidative stress, characterized by an increase in the content of reactive oxygen species (ROS) and carbonylated proteins, associated with a decrease in reduced glutathione (GSH) levels and catalase activity. Cur and Nano-cur treatment, both topically and orally, modified the markers of oxidative stress, preventing the production of ROS and carbonylated proteins and the decrease of GSH levels. Altogether, the data showed that Cur and Nano-cur preparations, when administered at the same dose topically, similarly inhibited the inflammatory and oxidative response (via reduction of edema, MPO activity, and production of ROS, and increase of antioxidant agents such as GSH). On the other hand, when the preparations were orally administered, Nano-cur inhibited the formation of edema at a dose eight times lower than Cur, suggesting a better bioavailability of Nano-cur when compared to Cur.

**Keywords:** curcuminoids, inflammation, oxidative stress, percutaneous permeation, nanoencapsulation

## Sumário

1. INTRODUÇÃO .....	13
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	15
<b>2.1 Aninais</b> .....	15
<b>2.2 Indução do edema de orelha</b> .....	15
<b>2.3 Tratamento</b> .....	16
<b>2.4 Avaliação da atividade da mieloperoxidase (MPO)</b> .....	16
<b>2.5 Avaliação da Permeação Percutânea Utilizando a Técnica de Espectroscopia Fotoacústica (PAS)</b> .....	17
<b>2.6 Determinação do estresse oxidativo do tecido da orelha de camundongos</b> .....	17
<b>2.6.1 Preparação do tecido da orelha</b> .....	17
<b>2.6.2 Determinação do conteúdo de proteínas carboniladas</b> .....	18
<b>2.6.3 Determinação dos níveis de glutathiona reduzida</b> .....	18
<b>2.6.4 Determinação de espécies reativas de oxigênio</b> .....	18
<b>2.6.5 Determinação da atividade da catalase</b> .....	19
3. RESULTADOS .....	19
<b>3.1 Efeito dos curcuminóides livres e nanoencapsulados no edema de orelha e na atividade da mieloperoxidase (MPO)</b> .....	19
<b>3.2 Permeação Percutânea das Preparações Cur e Nano-cur</b> .....	23
<b>3.3 Estado oxidativo do tecido da orelha de camundongo</b> .....	25
4. DISCUSSÃO .....	27
5. CONCLUSÃO .....	31
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	32
7. REFERÊNCIAS.....	33

# 1. INTRODUÇÃO

A inflamação é uma resposta biológica do organismo a um agente agressor, envolvendo a participação de elementos vasculares e celulares que culminam com a síntese e liberação de mediadores inflamatórios como citocinas, óxido nítrico (NO), derivados do ácido araquidônico, entre outros (ANTUNES et al., 2017). Também pode ocorrer aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (*reactive oxygen species* - ROS), levando a um desequilíbrio entre a produção e o consumo de ROS e consequentemente lesão tecidual, dano de macromoléculas e peroxidação lipídica de membrana (HALLIWELL, 2007; KHANSARI, SHAKIBA, MAHMOUDI, 2009; VERBON, POST, BOONSTRA, 2012).

A função primária da resposta inflamatória é de defesa do organismo, entretanto esta resposta pode se tornar exacerbada e sem controle, acarretando sérios efeitos nocivos. Por isto, é de suma importância a utilização de substâncias que controlam ou modulam o seu desenvolvimento (GRIS et al., 2010).

Atualmente existem numerosos agentes com propriedade anti-inflamatória capazes de amenizar ou inibir a resposta inflamatória (BOGDAN, 2001; COXIB AND TRADITIONAL NSAID TRIALISTS (CNT) COLLABORATION, 2013). No entanto, estes fármacos, embora eficazes, podem causar efeitos adversos, tais como desconforto gastrointestinal, inibição da agregação plaquetária e toxicidade renal (BATLOUNI, 2010). Particularmente, nos processos inflamatórios cutâneos, os fármacos podem ser aplicados topicamente, e embora provocam efeitos adversos reduzidos, na maioria das vezes, não proporcionam o efeito farmacológico desejado (BELGE, BRUCK e GHORESCHI, 2014; MEGNA et al., 2017).

Assim, a busca de novos produtos que controlam ou modulam a resposta inflamatória, e ao mesmo tempo causam menor efeito adverso, é de grande interesse. Neste contexto, pesquisas que avaliam a atividade biológica de produtos naturais tem ganhado especial atenção (GAUTAM e JACHAK, 2009; BHAWANA et al., 2011).

A *Cúrcuma longa* L, planta pertencente à família Zingiberaceae, popularmente conhecida como açafrão, tem sua origem no Oriente Médio e se distribui mundialmente, se destacando tanto por suas propriedades alimentícias como também por suas atividades biológicas. Esta planta é utilizada na medicina tradicional por suas propriedades anti-inflamatória, antioxidante, antiulcerogênica, entre outras (LIJU,

JEENA e KUTTAN, 2011; SUN et al., 2012; FACCHI et al., 2016). Em especial, a atividade anti-inflamatória desta fécula deve-se ao grupo de pigmentos chamados curcuminóides, compostos por curcumina, dimetoxicurcumina, bis-dimetoxicurcumina e ciclocurcumina (AGGARWAL, KUMAR e BHARTI, 2003; KIUCHI et al., 1993; ZENG et al., 2007), sendo a curcumina o principal componente deste grupo e, portanto, a mais estudada (ASAKAWA et al., 1981; JURENKA, 2009).

Alguns estudos demonstram que a atividade anti-inflamatória dos curcuminóides pode ser atribuída à sua propriedade de inibir a expressão da enzima ciclo-oxigenase-2 (COX-2), diminuindo a produção de prostaglandina E-2 (PGE-2), e de algumas citocinas, como fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleucina-1 (IL-1), interleucina-6 (IL-6), interleucina-8 (IL-8), além de inibir a enzima óxido nítrico sintase (NOS) (GOEL, BOLAND e CHAUHAN 2001; ROCHA et al., 2014; BHAWANA et al., 2011). Adicionalmente, existem evidências mostrando que a curcumina inibe a produção de espécies reativas do oxigênio e a peroxidação lipídica, que estão envolvidos no processo inflamatório (TAYLOR e LEONARD, 2011). Estudos também mostram que a curcumina aumenta os níveis de glutathiona reduzida (GSH) e de outras enzimas com propriedade antioxidante (MENON e SUDHEER, 2007; SUN, ZHAO e HU, 2013).

Apesar das numerosas vantagens, os curcuminóides tem uso terapêutico limitado devido sua baixa biodisponibilidade após administração por via oral (SHAO et al., 2011), em decorrência de sua má absorção, rápida metabolização hepática e intestinal, rápida eliminação sistêmica e ausência de atividade farmacológica de seus metabólitos (ALLAM et al., 2015; SHAO et al., 2011; ZHONGFA et al., 2012).

Diante destes fatos, têm sido realizadas diversas estratégias com o objetivo de melhorar a solubilidade e a biodisponibilidade dos curcuminóides, dentre elas: utilização de adjuvantes, encapsulação em nanopartículas, associação com lipossomas, com micelas, ou com complexos de fosfolipídeos (GRESSLER et al., 2015) e complexada com polímeros hidrofílicos biocompatíveis, tais como a dextrana, o quitosano, o álcool polivinílico e a poli(vinil pirrolidona) (PVP) (ALMEIDA et al., 2018; MANJU e SREENIVASAN, 2011).

Recentemente foi demonstrado que a nano e micro encapsulação da curcumina melhora significativamente sua biodisponibilidade quando administradas por via oral, aumentando a sua eficácia farmacológica (ALMEIDA et al., 2018; ROCHA et al., 2014). No entanto, pelo nosso conhecimento, poucos estudos foram realizados para

avaliar o efeito dos curcuminóides na inflamação cutânea (ver revisão de VAUGHN, BRANUM, e SIVAMANI, 2016). Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi avaliar nanopartículas de poli(vinil pirrolidona) contendo curcuminóides naturais da cúrcuma (curcumina, dimetoxicurcumina e bisdimetoxicurcumina), extraídos e encapsulados diretamente da raiz da planta. As atividades anti-inflamatória e antioxidante das nanopartículas foram avaliadas comparativamente aos curcuminóides livres (não encapsulados) no modelo experimental de inflamação cutânea induzida pelo óleo de cróton.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 Animais

Os experimentos foram realizados utilizando camundongos da linhagem *Swiss*, machos, pesando 25 - 30 g. Os animais foram mantidos em ambiente adequado com umidade (40-60%), temperatura (22°C +/- 2°C) e luminosidade (ciclo claro-escuro de 12 h/12 h), com livre acesso a ração e a água. O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Maringá (CEUA/UEM 2624080318).

### 2.2 Indução do edema de orelha

O edema foi induzido por aplicação de 20 µL de óleo de cróton (OC - 200 µg) diluído em acetona 70% (acetona/água 7:3, v/v veículo) na face interna da orelha esquerda do camundongo, adaptado da técnica de Schiantarelli et al. (1982). A orelha direita (não inflamada) recebeu apenas a aplicação tópica de 20 µL do veículo (acetona 70%), utilizado para diluir o agente irritante. Seis horas após da aplicação do OC, os animais foram anestesiados e sacrificados, as orelhas foram seccionadas em discos de 6,0 mm de diâmetro e pesadas (mg) em balança analítica. O edema de orelha foi avaliado como um aumento no peso da orelha. A porcentagem de inibição do edema foi determinada de acordo com a seguinte equação:

$$\% \text{ inibição} = 100 \times \frac{(\text{Média do peso das OE}_{\text{inflamada}} - \text{Média do peso das OE}_{\text{tratada}})}{(\text{Média do peso das OE}_{\text{inflamada}} - \text{Média do peso das OD}_{\text{controle}})}$$

Onde: OE = orelha esquerda, OD = orelha direita, Inflamada = orelha que recebeu óleo de cróton, Controle = orelha que recebeu acetona/água e Tratada = orelha que recebeu óleo de cróton e tratamento com Cur ou Nano-cur.

### **2.3 Tratamento**

As preparações de curcuminóides livres (Cur) e curcuminóides nanoencapsulados em polivinilpirrolidona (Nano-cur) foram obtidas de acordo com Santos et al., 2019 e fornecidas pelo Laboratório de Tecnologia de Alimentos da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (Campo Mourão-PR). O tratamento com as preparações, por via tópica (20 µL), foi feito imediatamente após a aplicação do OC. Os animais (5-7 animais/grupo) foram divididos nos seguintes grupos experimentais: 1) Controle inflamado (OC); 2) Controle não inflamado (V); 3, 4, 5, 6 e 7) Cur (tratados com curcuminóides livres suspensos em água) nas doses de 0,50; 0,25; 0,125; 0,0625; 0,03125 mg/orelha, respectivamente; 8, 9, 10, 11 e 12) Nano-cur (tratados com curcuminóides nanoencapsulados solubilizados em água), nas doses de 0,50; 0,25; 0,125; 0,0625; 0,03125 mg/orelha, respectivamente; 13) Indo (indometacina - anti-inflamatório de referência) na dose de 1 mg/orelha.

Outros grupos de animais (7 animais/grupo) receberam o tratamento por via oral (gavagem), uma hora antes da aplicação do OC: 14) Controle Inflamado (OC, tratado com água); 15) Controle não inflamado (V); 16, 17 e 18) Cur (tratados nas doses de 100, 200 e 400 mg/Kg, respectivamente); 19, 20 e 21) Nano-cur (tratados nas doses de 12,5, 25 e 50 mg/Kg, respectivamente); 22) Indo (tratados com indometacina na dose de 5 mg/Kg).

### **2.4 Avaliação da atividade da mieloperoxidase (MPO)**

As secções de orelhas coletadas foram colocadas em tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 6,0, contendo 0,5 % de brometo de hexadeciltrimetil-amônio (Sigma - 1 mL/50 mg de tecido) e processadas em homogeneizador (60 s à 0°C). O homogenato foi agitado em vórtex e centrifugado por 15 min a 2500 rpm. O sobrenadante foi imediatamente coletado e armazenado a -80°C para análises posteriores. O sobrenadante (0,01mL) obtido foi adicionado em microplaca de 96 cavidades, em triplicada, sendo a seguir, adicionado uma solução contendo dihidroclorato de o-dianisidina (Sigma - 0,167 mg/mL) e peróxido de hidrogênio (0,0005%) em tampão fosfato de potássio (50 mM, pH 6,0). A reação foi interrompida com solução de acetato de sódio 1,46 M (pH=

3,0) seguindo a técnica de Bradley et al. (1982) com modificações. A atividade da enzima foi determinada pela técnica de ponto final pela medida de absorvância em comprimento de onda de 460 nm. Os resultados foram expressos em densidade óptica (DO).

## **2.5 Avaliação da Permeação Percutânea Utilizando a Técnica de Espectroscopia Fotoacústica (PAS)**

Para os ensaios de PAS foram escolhidos os grupos de animais em que o tratamento foi mais efetivo em inibir a formação do edema e a atividade da MPO. Desta forma, os ensaios de PAS foram realizados nos tecidos de secções de orelhas de camundongos dos grupos: controle inflamado (OC); normal (pele ventral e pele dorsal); e tratados por via cutânea com Cur (0,25 mg/orelha) e com Nano-cur (0,25 mg/orelha). As amostras foram primeiramente iluminadas na face ventral, lado em que o edema foi induzido, e, posteriormente, na face dorsal, lado oposto ao da sua aplicação tópica. Este procedimento é utilizado para detectar a permeação das substâncias no tecido da orelha. Os espectros fotoacústicos foram obtidos, nas regiões espectrais do ultravioleta e do visível, com variação de comprimento de onda de 200 a 800 nm. A potência da fonte foi de 800 W e a frequência de modulação da luz foi de 13 Hz.

## **2.6 Determinação do estresse oxidativo do tecido da orelha de camundongos**

### **2.6.1 Preparação do tecido da orelha**

Para os ensaios de estresse oxidativo foram selecionados os grupos de animais em que os tratamentos foram mais efetivos para inibir a formação do edema (animais tratados com Cur e Nano-cur nas doses de 0,25 mg/orelha por via tópica, e animais tratados por via oral com Cur na dose de 400 mg/Kg e Nano-cur na dose de 50 mg/Kg). Após a eutanásia, as orelhas foram cirurgicamente removidas, imediatamente clampeadas em nitrogênio líquido e estocadas a aproximadamente -80°C. As mesmas foram pesadas, maceradas e homogeneizadas em homogeneizador do tipo Van Potter Elvhjem com dez volumes de tampão fosfato de potássio 0,1 M (pH 7,4). O homogenato total foi utilizado para determinação do conteúdo de glutathiona reduzida (GSH). Para as determinações da atividade da enzima antioxidante, catalase, assim como também do conteúdo de espécies reativas de oxigênio (ROS) e de proteínas carboniladas, foi utilizado o sobrenadante obtido após a centrifugação do homogenato a 10.000xG por 15 minutos. O conteúdo proteico do homogenato e do sobrenadante

obtido após centrifugação foi determinado conforme descrito por Lowry et al. (1951) utilizando albumina bovina como padrão.

### **2.6.2 Determinação do conteúdo de proteínas carboniladas**

O conteúdo de proteínas carboniladas foi determinado pelo método do 2,4 dinitrofenilhidrazina (DNPH) como descrito por Levine et al., (1990). O sobrenadante obtido após centrifugação do homogenato foi incubado com DNPH 10 mM em ácido clorídrico (HCl - 2 N) e mantidas em temperatura ambiente. Após 1 hora, as proteínas complexadas a derivados hidrazona foram precipitadas com ácido tricloroacético, centrifugadas, e o *pellet* lavado 3 vezes com uma mistura de etanol:etilacetato (1:1) para remoção do excesso de DNPH. Antes de cada centrifugação, o *pellet* foi levemente homogeneizado no vórtex e mantido 10 minutos com solução de lavagem. A proteína precipitada foi redissolvida em guanidina-HCl 6 M e a absorbância da solução determinada em 370 nm. O conteúdo de proteínas carboniladas foi calculado com base no coeficiente de extinção molar de  $22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ , e os resultados expressos em  $\eta\text{mol}$  de grupamentos carbonil por mg de tecido fresco.

### **2.6.3 Determinação dos níveis de glutathiona reduzida**

Os níveis de glutathiona reduzida (GSH) foram determinados por espectrofluorimetria conforme descrito por Hissin e Hilf (1976), com modificações (PARDO-ANDREU et al., 2007). Alíquotas de 50  $\mu\text{L}$  de homogenato foram adicionadas a 1,0 mL de um meio contendo sacarose 125 mM, cloreto de potássio (KCl) 65 mM e HEPES 10 mM (pH 7,2). Após precipitação de proteínas com 0,5 mL de ácido tricloroacético (TCA) 13%, a amostra foi centrifugada a 9.000xG por 3 minutos. Na seqüência, 100  $\mu\text{L}$  do sobrenadante foi incubado a 2,0 mL de um meio contendo fosfato monossódico ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) 0,1 M e ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) 5 mM, pH 8,0. 15 minutos após a adição de o-ftalaldeído 1 mg/mL, a fluorescência foi determinada em um espectrofluorímetro RF-5301 (Shimadzu) com comprimentos de onda de 350 nm para excitação e 420 nm para emissão. A concentração de glutathiona reduzida foi expressa como nmols de GSH por mg de tecido fresco.

### **2.6.4 Determinação de espécies reativas de oxigênio**

Os níveis de ROS foram quantificados por espectrofluorimetria, via 2,7dichlorofluoresceína diacetato (DCFH-DA), conforme descrito por Siqueira et al.

(2005). Este método mede a conversão do estável, não fluorescente, DCFH-DA para a molécula oxidada e altamente fluorescente 2,7 dichlorofluoresceína (DCF), na presença de esterases e ROS, especialmente peróxido de hidrogênio. A reação foi iniciada com a adição de DCFA-DA 100  $\mu$ M, incubada por 30 minutos a 37°C e então paralisado em banho de gelo. A formação do DCF foi avaliada no fluorímetro com comprimentos de onda de 504 nm para excitação e 529 nm para emissão. Todos os passos foram realizados no escuro e os resultados expressos em  $\eta$ mol de ROS por mg de tecido a partir de uma curva padrão de DCF.

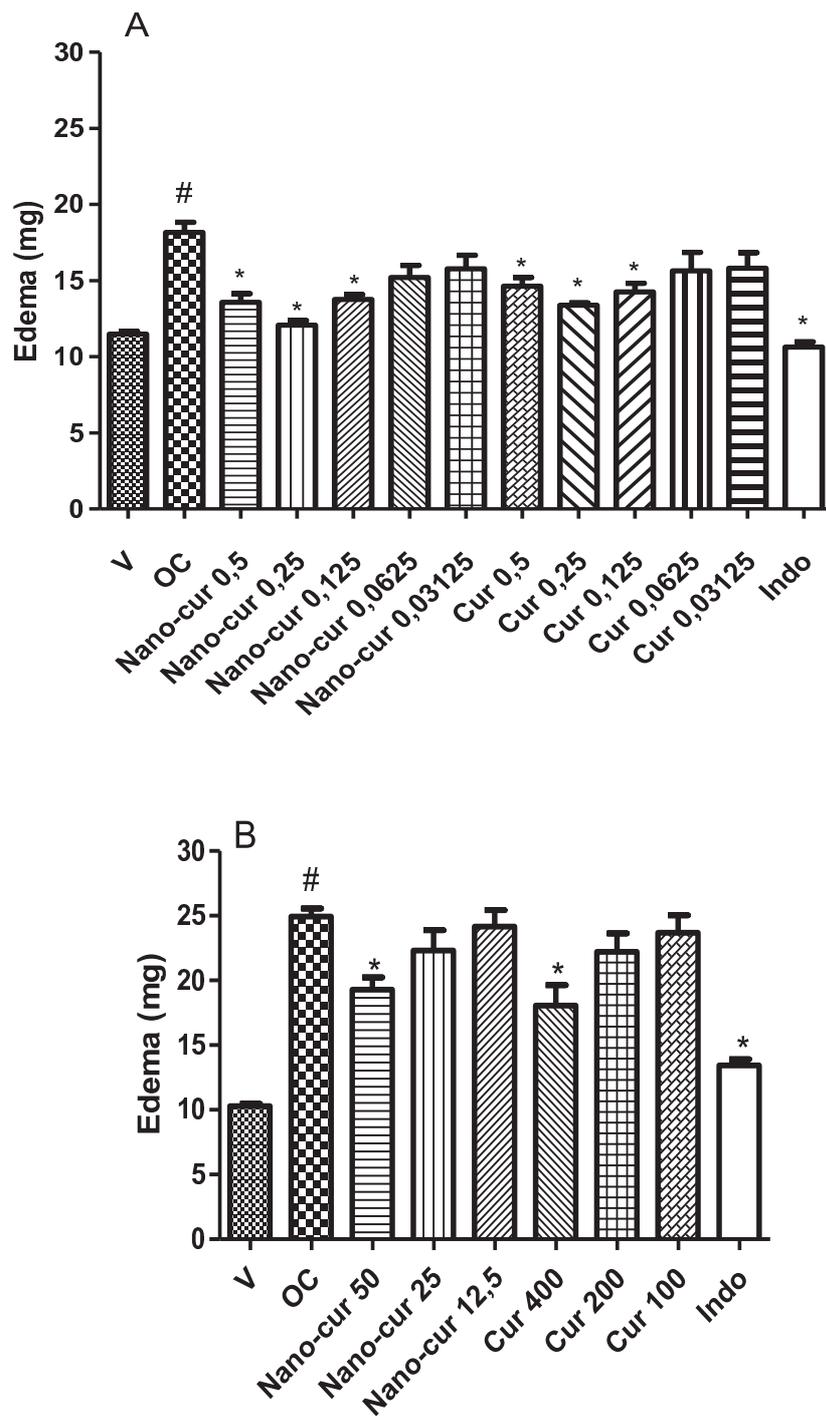
### **2.6.5 Determinação da atividade da catalase**

A atividade da enzima catalase (CAT) foi avaliada pela decomposição enzimática do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> medida diretamente por espectrofotometria em 240 nm, conforme descrito por Aebi et al. (1974). Alíquotas do sobrenadante (aproximadamente 0,1 mg proteína) foram adicionados a 0,98 mL de uma solução contendo Tris 50 mM, EDTA 0,25 mM e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30 mM (pH 8,0) e a queda da absorbância monitorada por um minuto a 25°C. A velocidade inicial da reação foi extrapolada e a atividade da enzima foi calculada utilizando o coeficiente de extinção molar obtido a partir de uma curva de calibração com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, e os valores expressos como  $\mu$ mol de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por minuto por mg de proteína.

## **3. RESULTADOS**

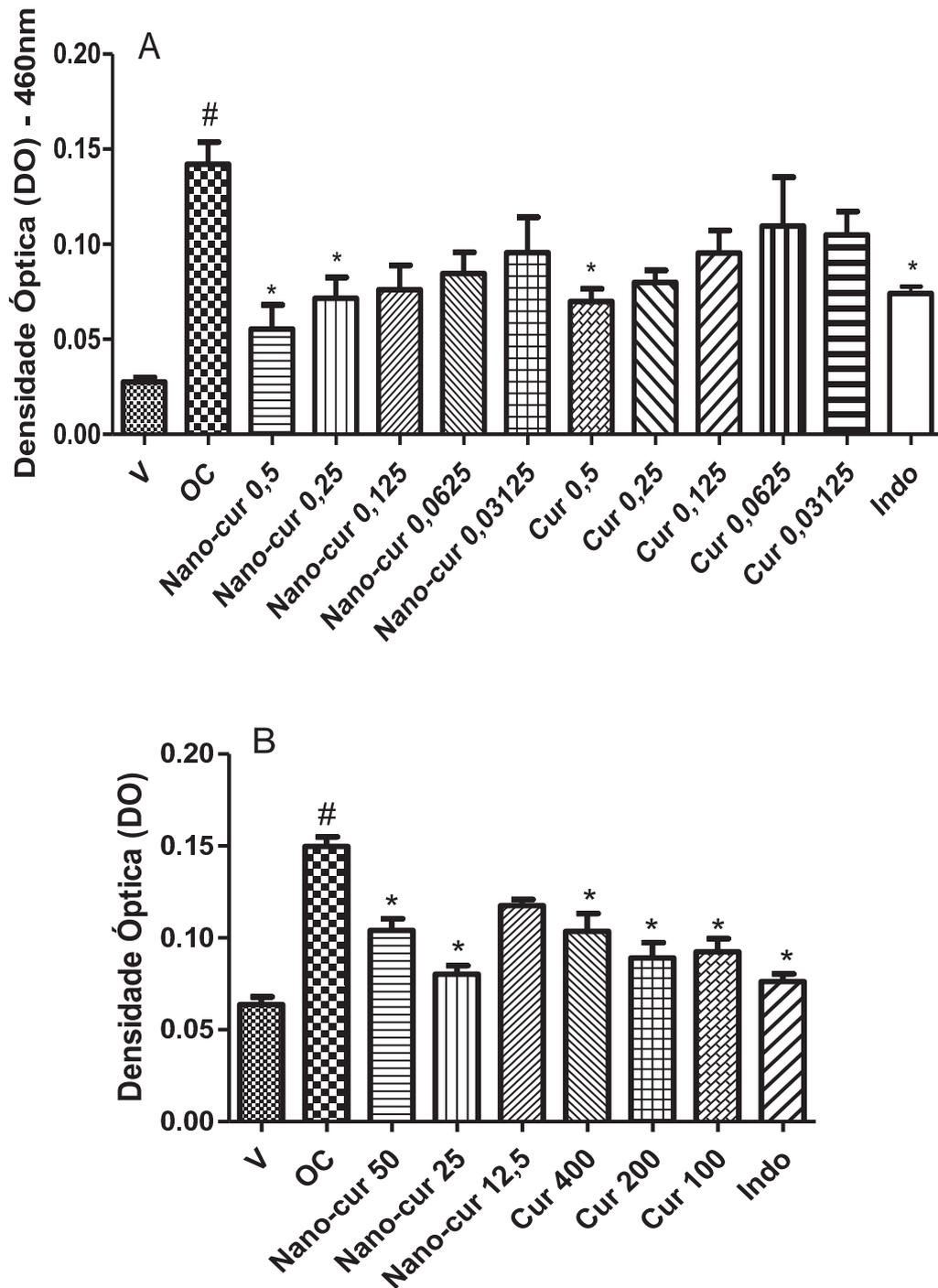
### **3.1 Efeito dos curcuminóides livres e nanoencapsulados no edema de orelha e na atividade da mieloperoxidase (MPO)**

A aplicação do OC provocou uma evidente resposta inflamatória quando comparado ao grupo controle não inflamado (V), que recebeu apenas a aplicação do veículo (acetona/água 7:3, v/v). A aplicação tópica das preparações de Cur (0,5; 0,25 e 0,125 mg/orelha) e Nano-cur (0,5; 0,25; 0,125 mg/orelha) reduziram o edema de orelha (53%, 71%, 58%, 68%, 91% e 66%, respectivamente - Figura 1A). O tratamento por via oral (gavagem) com as preparações de Cur 400 mg/kg e Nano-cur na dose de 50 mg/kg reduziram a formação do edema (46% e 38%, respectivamente -Figura 1B). A indometacina administrada por via tópica e por via oral, utilizada como anti-inflamatório de referência, reduziu o edema (88% e 78%, respectivamente - Figuras 1A e 1B).



**Figura 1:** Efeito dos curcuminóides livres (Cur) e de nanopartículas contendo curcuminóides (Nano-cur) no edema de orelha induzido pelo óleo de cróton (OC - 200  $\mu$ g) em camundongos. Os animais foram tratados por (A) via tópica nas doses de 0,5; 0,25; 0,125; 0,0625 e 0,03125 mg/orelha de Cur e Nano-cur, e por (B) via oral nas doses de 400; 200 e 100 de Cur e 50,0; 25,0 e 12,5 de Nano-cur. Orelhas controle não inflamadas (V). Cada barra vertical representa a média  $\pm$  E.P.M.da massa das orelhas de cada grupo, 6 horas após aplicação do agente flogístico. #  $P < 0,05$  quando comparado ao grupo controle inflamado não inflamado (V); \*  $P < 0,05$  quando comparado ao grupo controle inflamado (OC - ANOVA seguido de teste de Tukey).

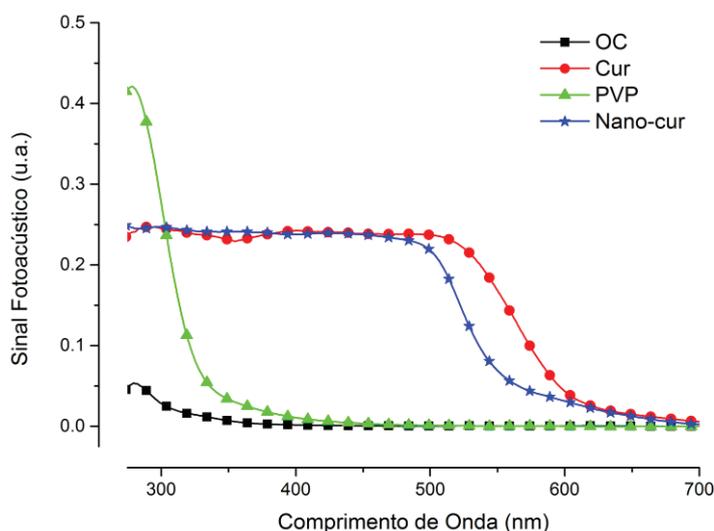
Seis horas após a indução da resposta inflamatória, a atividade da MPO estava aumentada no grupo controle inflamado (OC) quando comparada ao grupo controle não inflamado (V). As preparações de Cur (0,5 mg/orelha) e Nano-cur (0,5 e 0,25 mg/orelha), administrados por via tópica, e Cur (400; 200 e 100 mg/kg) e Nano-cur (50,0; 25,0 mg/kg), administrados por via oral, reduziram a atividade da enzima (63%, 75% e 61%; 53%, 70%, 66%, 53% e 80%, respectivamente (Figuras 2A e 2B). A aplicação tópica e oral da indo inibiu a atividade da MPO (59% e 89%, respectivamente - Figuras 2A e 2B).



**Figura 2:** Efeito da curcuminoídes livres (Cur) e de curcuminoídes nanoencapsulados (Nano-cur) sobre a atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) no tecido da orelha de camundongos. Os animais foram tratados por (A) via tópica nas doses de 0,5; 0,25; 0,125; 0,0625 e 0,03125 mg/orelha de Cur e Nano-cur, e por (B) via oral nas doses de 400; 200 e 100 de Cur e 50,0; 25,0 e 12,5 de Nano-cur. Orelhas controles não inflamadas (V). Cada coluna representa a média  $\pm$  E.P.M. da atividade da MPO, 6 horas após a aplicação do agente flogístico. #  $P < 0,05$  quando comparado ao grupo não inflamado (V); \*  $P < 0,05$  quando comparado ao grupo controle inflamado (OC – ANOVA, seguido de teste de Tukey).

### 3.2 Permeação Percutânea das Preparações Cur e Nano-cur

Os espectros fotoacústicos das substâncias OC, Cur, PVP e Nano-cur, obtidos pela técnica de PAS estão apresentados na Figura 3. Como observado estas substâncias apresentaram bandas em seus espectros fotoacústicos na região entre 200 a 700 nm. O espectro do OC é uma banda larga, apresentando absorção óptica abaixo de 400 nm. As preparações de Cur e de Nano-cur apresentaram absorção óptica de 200 a 700 nm. O espectro do PVP apresentou absorção óptica na região de 200 a 400 nm. A detecção destas bandas características dos espectros do PVP, Cur ou Nano-cur ao longo da espessura do tecido da orelha seria um marcador da presença das substâncias topicamente aplicadas.

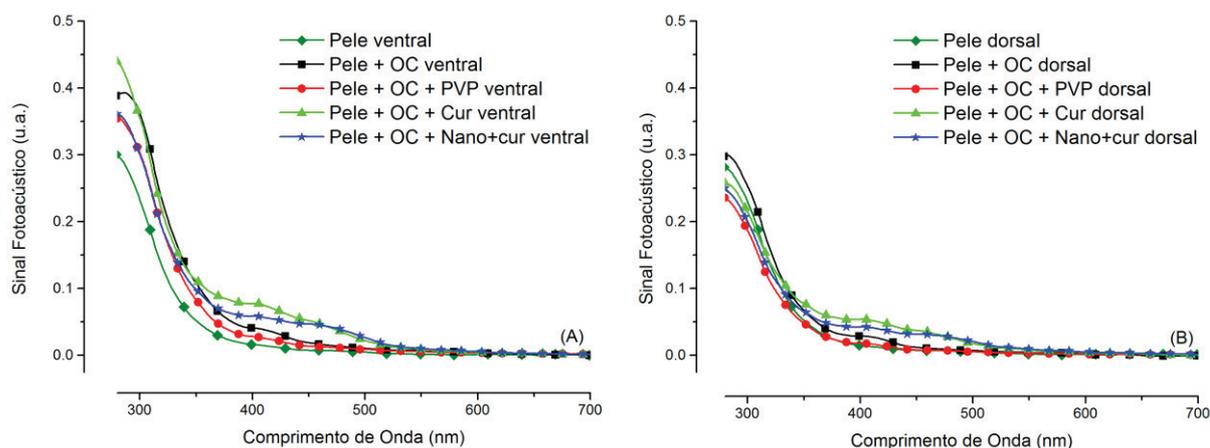


**Figura 3:** Espectros fotoacústicos das substâncias óleo de cróton (OC), curcuminóides livres (Cur), poli(vinil pirrolidona) (PVP) e curcuminóides nanoencapsulados (Nano-cur).

A Figura 4A mostra os espectros obtidos da leitura da face ventral do tecido da orelha de animais normais (pele ventral), da orelha após a indução do processo inflamatório pelo OC (pele + OC ventral) e das orelhas inflamadas e tratadas com o PVP (pele + OC + PVP ventral), com Cur (pele + OC + Cur ventral) ou com Nano-cur (pele + OC + Nano-cur ventral). Os espectros do tecido da orelha tratada com as preparações de Cur e de Nano-cur apresentaram características espectrais semelhantes, com uma banda larga de 350 a 500 nm, região característica da absorção óptica dessas substâncias. Devido à sobreposição da banda referente ao PVP com as bandas da pele, não foi possível observar diretamente a presença desta substância.

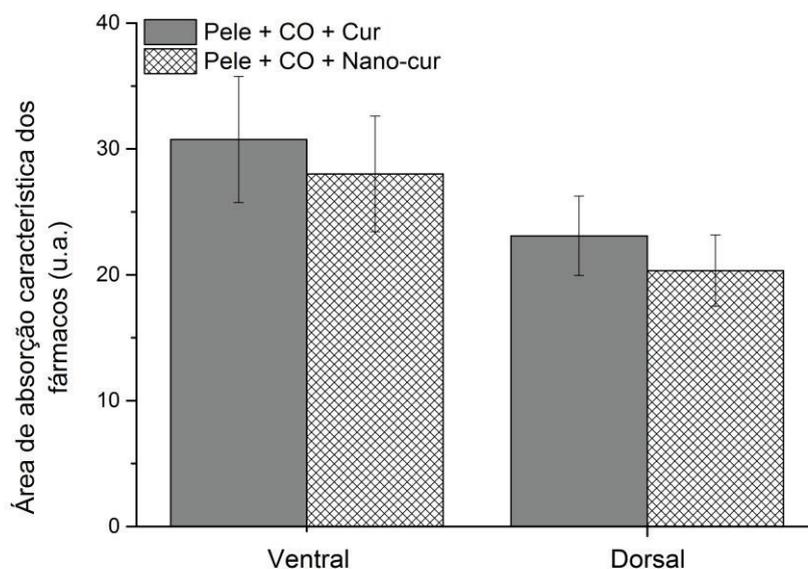
A Figura 4B mostra os espectros obtidos da leitura da face dorsal do tecido da orelha de animais normais (pele dorsal), de orelhas após a indução do processo

inflamatório pelo OC (pele + OC dorsal) e de orelhas inflamadas e tratadas com o PVP (pele + OC + PVP dorsal), com Cur (pele + OC + Cur dorsal) ou com Nano-cur (pele + OC + Nano-cur). Os resultados da avaliação dos perfis de permeação, das substâncias no tecido, indicam a presença da preparação de Cur e da Nano-cur na face dorsal, evidenciada pelo aumento da absorção óptica na região de 350 a 500, em comparação com o espectro da pele dorsal.



**Figura 4:** (A) Espectros fotoacústicos obtidos nas leituras das faces ventrais dos tecidos das orelhas 6 horas após a aplicação tópica do óleo de cróton (OC) na face ventral; (B) Espectros fotoacústicos obtidos nas leituras das faces dorsais dos tecidos das orelhas 6 horas após a aplicação tópica do OC na face ventral.

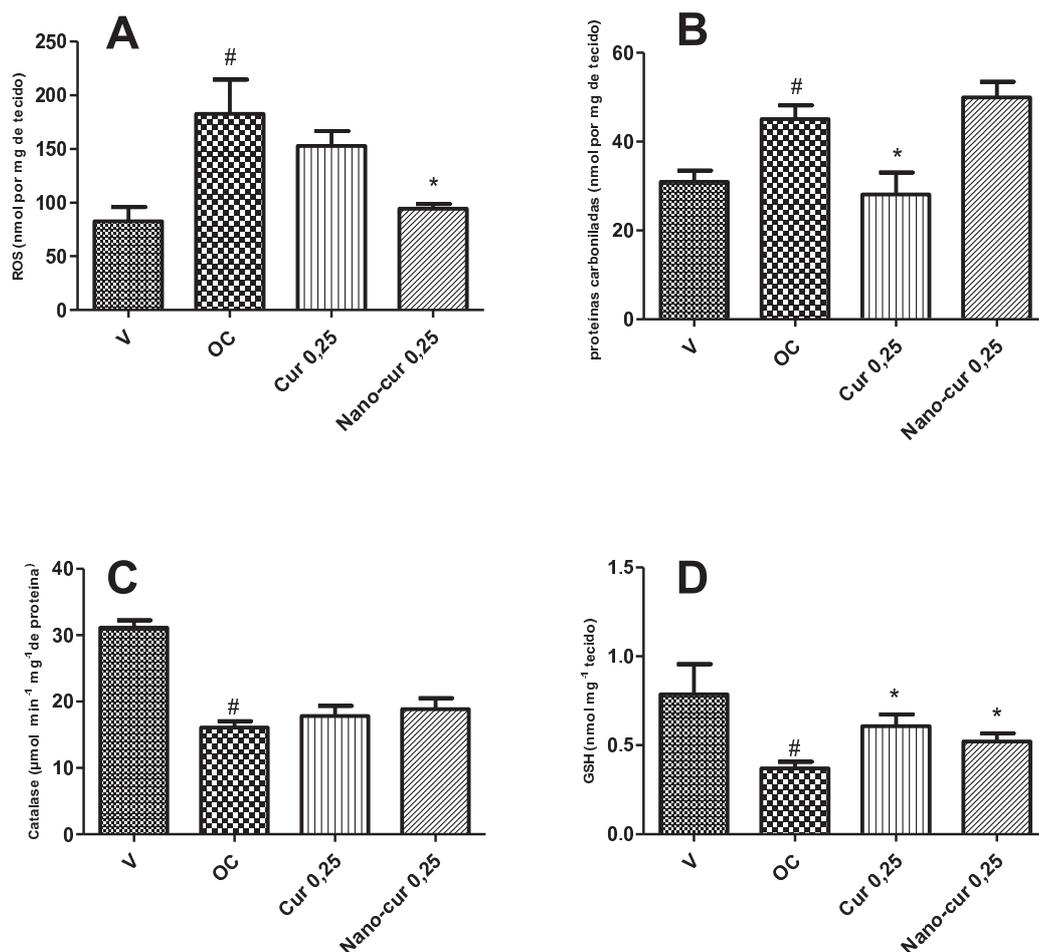
Quando comparamos a permeação das preparações de Cur e de Nano-cur foi possível verificar que a permeação de ambas foi similar (Figura 5).



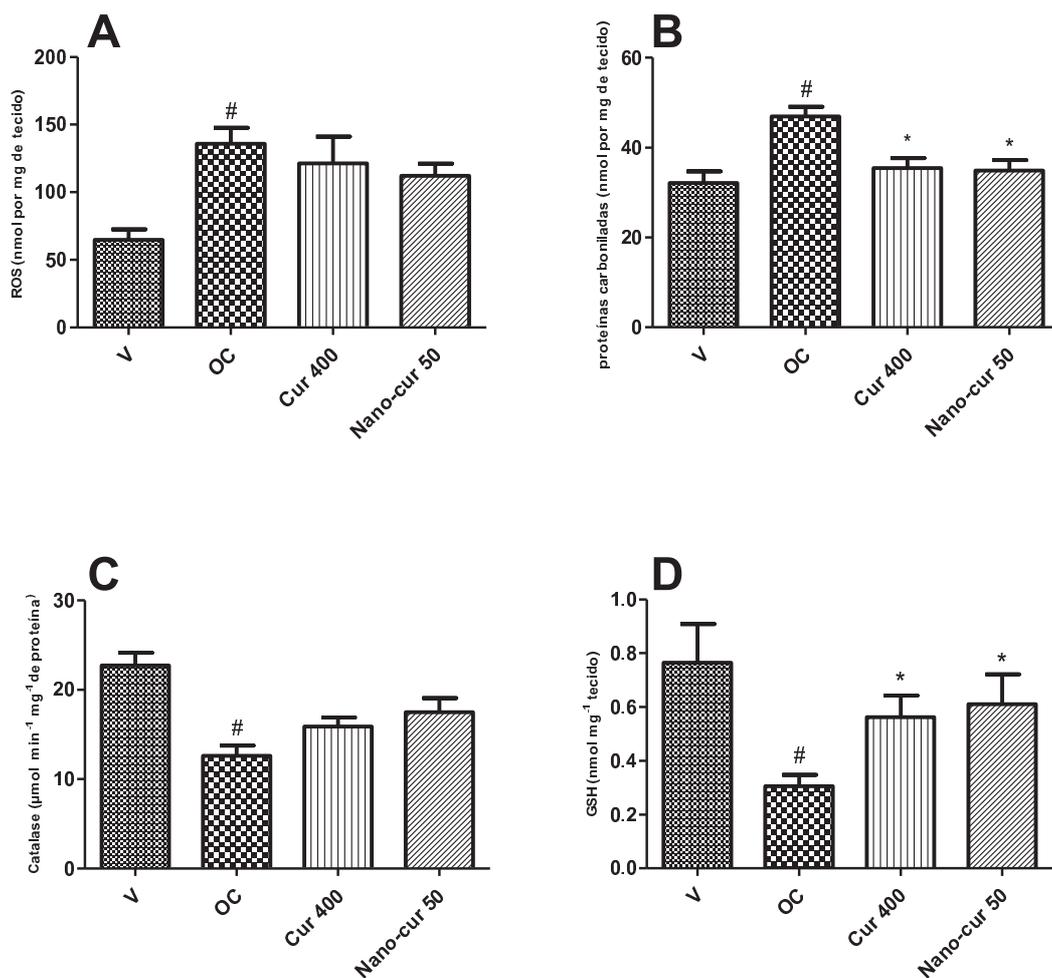
**Figura 5:** Área de absorção característica dos curcuminóides livres (Cur) e dos curcuminóides nanoencapsulados (Nano-cur) no tecido da orelha inflamada (OC).

### 3.3 Estado oxidativo do tecido da orelha de camundongo

Os ensaios de estresse oxidativo mostraram que o OC alterou parâmetros oxidativos, provocando aumento na produção de ROS, aumento no conteúdo de proteínas carboniladas e diminuição da atividade da catalase e do conteúdo de GSH (Figuras 6 e 7). As preparações de Cur, tanto administradas topicamente, quanto oralmente, preveniu o aumento nos níveis de proteínas carboniladas (Figura 6B e 7B, respectivamente) e a depleção nos níveis de GSH (Figura 6D e 7D, respectivamente). A preparação de Nano-cur, administrada topicamente, foi efetiva em prevenir o aumento de ROS (Figura 6A) e a depleção do GSH (Figura 6D), e, quando administrada oralmente, preveniu o aumento no conteúdo de proteínas carboniladas (Figura 7B) e a depleção nos níveis de GSH (Figura 7D). Os tratamentos, tanto tópicos quanto orais, não foram capazes de prevenir a diminuição na atividade da enzima antioxidante catalase (Figura 6C e 7C, respectivamente).



**Figura 6:** Efeito dos curcuminóides livres (Cur) e de nanopartículas contendo curcuminóides (Nano-Cur) administrados topicamente sobre A) Espécies reativas de oxigênio (*reactive oxygen species* - ROS), B) Proteínas carboniladas, C) Catalase e D) Glutaciona reduzida (GSH) induzido pelo óleo de cróton (OC - 200  $\mu\text{g}$ ) nas orelhas de camundongos *Swiss*. Cada barra vertical representa a média  $\pm$  E.P.M.do peso das orelhas de cada grupo, 6 horas após aplicação do OC. Orelhas controles não inflamadas (V) foram tratadas com água. #  $P < 0,05$  quando comparado ao grupo controle inflamado não inflamado (V); \*  $P < 0,05$  quando comparado ao grupo controle inflamado (OC - ANOVA seguido de teste de Tukey).



**Figura 7:** Efeito dos curcuminóides livres (Cur) e de nanopartículas contendo curcuminóides (Nano-Cur) administrados oralmente sobre A) Espécies reativas de oxigênio (*reactive oxygen species* -ROS), B) Proteínas carboniladas, C) Catalase e D) Glutathiona reduzida (GSH) induzido pelo óleo de cróton nas orelhas de camundongos. Cada barra vertical representa a média  $\pm$  E.P.M.do peso das orelhas de cada grupo, 6 horas após aplicação do OC. Orelhas controles não inflamadas (V) foram tratadas com água. #  $P < 0,05$  quando comparado ao grupo controle inflamado não inflamado (V); \*  $P < 0,05$  quando comparado ao grupo controle inflamado (OC - ANOVA seguido de teste de Tukey).

## 4. DISCUSSÃO

No presente estudo investigamos o efeito anti-inflamatório de preparações de curcuminóides nanoencapsulados em poli(vinil pirrolidona) (Nano-cur) e curcuminóides livres (Cur) no modelo de inflamação cutânea induzida pelo óleo de cróton (OC). Este modelo tem sido amplamente utilizado para avaliar a atividade anti-inflamatória de compostos naturais e sintéticos, com a perspectiva de serem utilizados no tratamento de

doenças inflamatórias cutâneas (GARG, RAMCHANDANI e MARU, 2008; MURAKAWA et al. 2006).

O OC é uma mistura lipídica que contém o 12-O-teradecanoilforbol-13-acetato (TPA) e outros ésteres de forbol que possuem propriedades irritativas quando aplicados no tecido cutâneo de camundongos (GARG, RAMCHANDANI e MARU, 2008; MURAKAWA et al. 2006). A resposta inflamatória induzida pelo OC é caracterizada por formação de edema e recrutamento de leucócitos no local da lesão. A reação é desencadeada por ativação de vias enzimáticas com consequente produção/liberação de mediadores inflamatórios, tais como prostaglandinas, leucotrienos e citocinas pró inflamatórias (TNF, IL-1 $\beta$ , IL-6, entre outras) e quimiocinas (CXCL-1, CCL2, entre outras) (GARG, RAMCHANDANI, MARU, 2008; MURAKAWA et al. 2006).

O tratamento com as preparações de Cur e Nano-cur tanto por via tópica como por via oral inibiu o desenvolvimento da resposta inflamatória (edema e atividade da enzima MPO, marcador indireto de recrutamento de leucócitos). No entanto, a eficácia anti-inflamatória das preparações foi diferente de acordo com a via de administração utilizada.

O tratamento por via tópica, com ambas as preparações, apresentou efeito inibitório similar sobre o desenvolvimento do edema e da atividade da MPO. Adicionalmente, foi observado pela técnica de PAS que a permeação percutânea de ambas as preparações aplicadas por via tópica também foi similar, atingindo as camadas mais profundas da pele, onde o processo inflamatório ocorre. Esta evidência pode explicar a eficácia anti-inflamatória tanto da Cur como da Nano-cur quando aplicadas topicamente neste modelo experimental. No entanto, quando as preparações de Cur e Nano-cur foram administradas por via oral, a Nano-cur mostrou maior eficácia anti-inflamatória quando comparada a Cur. Como observado, a Nano-cur mostrou um efeito inibitório sobre o desenvolvimento do edema de orelha em dose oito vezes menor e sobre a atividade da MPO em dose quatro vezes menor do que a Cur.

Alguns estudos clínicos mostram a eficácia farmacológica da curcumina e de curcuminóides, administrados por via oral ou tópica, em doses altas, em pacientes portadores de doenças de pele (psoríase, vitiligo, dermatite atópica, foto-envelhecimento, entre outras) (ver revisão de VAUGHN, BRANUM, e SIVAMANI, 2016).

Adicionalmente outros modelos experimentais demonstram que a curcumina (componente majoritário dos curcuminóides) exerce atividade anti-inflamatória por

inibir a expressão da enzima ciclo-oxigenase 2 (COX<sub>2</sub>) (AGGARWAL, KUMAR e BHARTI, 2003; GOEL, BOLAND e CHAUHAN, 2001), a produção de citocinas pró-inflamatórias (TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-8) e a enzima óxido nítrico sintase (ROCHA et al., 2014; BHAWANA et al., 2011). Assim, podemos sugerir que o efeito inibitório das preparações de Cur e Nano-cur sobre o desenvolvimento da resposta inflamatória induzida pelo OC, observado no presente estudo, pode estar relacionado a uma ação inibitória sobre os mediadores inflamatórios envolvidos nesta resposta. Isto é suportado por dados recentemente publicados, os quais demonstram que as preparações de Cur e Nano-cur são compostas por  $56,6 \pm 0,2\%$  de curcumina,  $21,3 \pm 0,1\%$  de desmetoxicurcumina e  $22,1 \pm 0,1\%$  de bisdesmetoxicurcumina (SANTOS et al., 2019). Neste contexto, podemos sugerir que a curcumina tem uma participação importante no efeito inibitório das preparações de Cur e Nano-cur sobre a resposta inflamatória induzida pelo OC, não descartando, no entanto, a participação dos outros curcuminóides.

Estudos anteriores utilizando sistemas de liberação de fármacos similares ao que foi utilizado neste trabalho, mostram que a curcumina administrada por via oral inibe significativamente a resposta inflamatória aguda (ALMEIDA et al., 2018; ROCHA et al., 2014). Portanto, podemos sugerir que o processo de nanoencapsulação é importante para proteção da curcumina e dos curcuminóides *in natura* contra a biodegradação após administração oral, melhorando a biodisponibilidade e a atividade biológica dos mesmos. Quando aplicados por via tópica, os curcuminóides, mesmo não encapsulados, não são metabolizados, atingindo o sítio inflamatório, o que foi comprovado pela técnica de PAS.

Outro achado interessante deste estudo foi que a aplicação de OC na orelha do camundongo provocou alterações nos parâmetros oxidativos, caracterizadas por um aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (*reactive oxygen species* – ROS) e do conteúdo de proteínas carboniladas, um biomarcador da oxidação proteica, além de uma diminuição de fatores que atuam como antioxidantes, como a enzima catalase e a GSH. Pelo nosso conhecimento, não tem estudos mostrando o papel do estresse oxidativo na resposta inflamatória cutânea induzida pelo OC. Corroborando nossos resultados, Georgetti et al. (2013) mostraram que a aplicação de TPA, constituinte do OC, no dorso de camundongos *hairless* (HRS/J) provoca um aumento da produção dos níveis de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e da peroxidação lipídica, além intensa depleção da GSH e da catalase.

Como sabido, na vigência de um processo inflamatório há um aumento da produção de ROS (SULTANA e SALEEM, 2004), provocando dano celular por causar oxidação de proteínas, lipídios e ácido desoxirribonucleico (DNA) (BROUET E OHSHIMA 1995; DIKSHIT et al., 1995; MORTELLINI et al., 2000; SINGH E SHARMA, 2011). Por outro lado, a célula possui defesas antioxidantes que são responsáveis por eliminar estas ROS, como a glutathiona reduzida (GSH), peptídeo responsável por eliminar diretamente os radicais livres por transferência de hidrogênio (CASAGRANDE et al. 2006). A catalase é uma enzima que também faz parte do sistema de defesa, que atua decompondo o peróxido de hidrogênio, metabólito tóxico, em água e oxigênio molecular (GAETANI et al., 1989).

O tratamento tanto por via tópica como por via oral, com as preparações de Cur e Nano-cur preveniu as alterações em alguns parâmetros oxidativos, impedindo o aumento no conteúdo de ROS e de proteínas carboniladas e a depleção de GSH. A redução do conteúdo de proteínas carboniladas pode estar relacionada a uma diminuição nos níveis de ROS. Uma explicação para isto é que o tratamento com a Cur ou Nano-cur pode atuar de forma direta diminuindo a produção ou eliminando as ROS, ou de forma indireta, aumentando a produção de agentes antioxidantes endógenos, como o GSH (conforme evidenciado no presente estudo).

A atividade da curcumina como agente antioxidante já foi demonstrada em outros modelos experimentais. Enquanto alguns estudos mostram que a curcumina atua diminuindo a produção e/ou aumentando a eliminação de ROS (CHILELLI et al., 2016; MANIKANDAN, 2004; REDDY e LOKESH, 1994; TAYLOR e LEONARD, 2011), outros mostram que o composto previne a depleção do conteúdo de GSH (BROUET e OHSHIMA, 1995; BULKU et al., 2012; DIKSHIT et al., 1995; HEWLINGS e KALMAN, 2017; MORTELLINI et al., 2000; SINGH e SHARMA, 2011;) e a redução da atividade da catalase (KANT et al. , 2014).

Diante destes resultados, é válido destacar que a atividade da Nano-cur quando administrados por via oral é decorrente da melhora da sua biodisponibilidade dos Cur uma vez que tais efeitos foram observados com dose de quatro a oito vezes menor. Por outro lado, a eficácia similar da Cur e da Nano-cur aplicados tópicamente pode ser explicada pelo fato dos Cur não sofrerem metabolismo de primeira passagem.

No conjunto os dados mostram que o processo de nanoencapsulação dos curcuminóides naturais é importante para proteção dos mesmos contra a biodegradação após administração por via oral. Quando administrados de forma tópica, os

curcuminóides não são metabolizados, atingindo o foco inflamatório mesmo quando não encapsulados. Assim, podemos sugerir que a atividade anti-inflamatória e antioxidante das preparações de Cur e Nano-cur são responsáveis pela inibição da resposta inflamatória cutânea induzida pelo OC em camundongos.

## **5. CONCLUSÃO**

No conjunto, os dados mostraram que as preparações de Cur e Nano-cur, quando administradas na mesma dose, por via tópica, inibiram, de modo similar, a resposta inflamatória e oxidativa. Por outro lado, quando as preparações foram administradas por via oral, a Nano-cur inibiu tais respostas em doses de quatro a oito vezes menor que a Cur, sugerindo uma melhor biodisponibilidade da Nano-cur quando comparada a Cur.

## 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os dados destes estudos mostraram que:

- As preparações de Cur e Nano-cur apresentaram atividade anti-inflamatória no modelo de edema de orelha induzido pelo óleo de cróton em camundongos;
- A atividade anti-inflamatória de ambas as preparações foi de mesma magnitude após aplicação por via tópica;
- A permeação percutânea das preparações de Cur e de Nano-cur foi similar, como evidenciado pela técnica de PAS;
- A Nano-cur apresentou maior eficácia anti-inflamatória após administração por via oral, quando comparada à Cur administrada pela mesma via;
- A aplicação de OC provocou alterações nos parâmetros oxidativos, ou seja, aumentou a produção de ROS e do conteúdo de proteínas carboniladas, e diminuiu a atividade da enzima catalase e o conteúdo GSH;
- O tratamento tanto por via tópica como por via oral com as preparações de Cur e Nano-cur preveniu as alterações em alguns parâmetros oxidativos, prevenindo o aumento no conteúdo de ROS e de proteínas carboniladas e a depleção de GSH.

## 7. REFERÊNCIAS

AEBI, H; WYSS, SR; SCHERZ, B; SKVARIL, F. Heterogeneity of Erythrocyte Catalase II. **FEBS J.**, v.48, n.1, p.137-145, 1974.

AGGARWAL, BB; KUMAR, A; BHARTI, AC. Anticancer potential of curcumin: preclinical and clinical studies. **Anticancer Res.**, v.23, n.1A, p.363-398, 2003.

ALLAM, AN; KOMEIL, IA; FOUDA, MA; ABDALLAH, OU. Preparation, characterization and in vivo evaluation of curcumin self-nano phospholipid dispersion as an approach to enhance oral bioavailability. **Int. J. Pharm.**, v.489, p.117–123, 2015.

ALMEIDA, M; ROCHA, BA; FRANCISCO, CRL; MIRANDA, CG; SANTOS, PDF; ARAÚJO, PHH; SAYER, C; LEIMANN, FV; GONÇALVES, OH; BERSANI-AMADO, CA. Evaluation of the *in vivo* acute antiinflammatory response of curcumin-loaded nanoparticles. **Food Funct.**, v.9, n.1, p.440-449, 2018.

ANTUNES, BM; ROSSI, FE; INOUE, DS; NETO, JC; LIRA, FS. Imunometabolismo e Exercício Físico: Uma nova fronteira do conhecimento. **Motricidade-Edições Desafio Singula**, v.3, n.1, p.85-98, 2017.

ASAKAWA, N; TSUNO, M; HATTORI, T; UHEYAMA, M; SHINODA, A; MIYAKE, Y. Determination of curcumin content of tumeric by high performance liquid chromatography. **Yakugaku Zasshi.**, v.101, p.374-377, 1981.

BATLOUNI, M. Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs: Cardiovascular, Cerebrovascular and Renal Effects. **Anti-Inflamatórios Não Esteroides: Efeitos Cardiovasculares, Cérebro Vasculares e Renais. Arq Bras Cardiol.**, v.94, n.4, p.556-563, 2010.

BELGE, K; BRÜCK, J; GHORESCHI, K. Advances in treating psoriasis. **F1000Prime Rep.**, v.6, 2014.

BHAWANA; BASNIWAL, RK; BUTTAR, HS; JAIN, VK; JAIN, N. Curcumin nanoparticles: preparation, characterization, and antimicrobial study. **J Agric. Food Chem.**, v.59, n.5, p.2056-2061, 2011.

BOGDAN C. Nitric oxide and the immune response. **NatImm.**, v.2, p.907-916, 2001.

BRADLEY, PP; PRIEBAT, DA; CHIRISTENSEN, RD; ROTHSTEIN, G. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. **J Invest Dermatol.**, v.78, p.206-209, 1982.

BROUET, I; OHSHIMA, H. Curcumin, an anti-tumour promoter and antiinflammatory agent, inhibits induction of nitric oxide synthetase in activated macrophages. **Biochem Biophys Res Commun.**, v.206, p.533-540, 1995.

BULKU, E; STOHS, SJ; CICERO, L; BROOKS, T; HALLEY, H; RAY, SD. Curcumin Exposure Modulates Multiple Pro-Apoptotic and AntiApoptotic Signaling Pathways to Antagonize Acetaminophen-Induced Toxicity. **Curr Neurovasc Res.**, n.9, p.58-71, 2012.

CASAGRANDE, R; GEORGETTI, SR; VERRI JR., WA, DORTA, DJ; DOS SANTOS, AC; FONSECA, MJV. Protective effect of topical formulations containing quercetin against UVB-induced oxidative stress in hairless mice. **J Photochem Photobiol B.**, v.84, n.1, p.21–27, 2006.

CHILELLI, NC; RAGAZZI, E; VALENTINI, R; COSMA, C; FERRARESSO, S; LAPOLLA, A; SARTORE, G. Curcumin and Boswellia serrata Modulate the Glyco-Oxidative Status and Lipo-Oxidation in Master Athletes. **Nutrients.**, v.8, 2016.

COXIB AND TRADITIONAL NSAID TRIALISTS (CNT) COLLABORATIONS. Vascular and upper gastrointestinal effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs: meta-analyses of individual participant data from randomized trials. **Lancet.**, v.382, n.9894, p.769-779, 2013.

DIKSHIT, M; RASTOGI, L; SHUKLA, R; SRIMAL, RC. Prevention of ischaemia-induced biochemical changes by curcumin and quinidine in the cat heart. **Ind J Med Res.**, v.101, p.31-35, 1995.

FACCHI, SP; SCARIOT, DB; BUENO, PVA; SOUZA, PR; FIGUEIREDO, LC; FOLLMANN, HDM; NUNES, CS; MONTEIRO, JP; BONAFÉ, EG; NAKAMURA, CV; MUNIZ, EC; MARTINS, AF. Preparation and cytotoxicity of N-modified

chitosan nanoparticles applied in curcumin delivery. **Int J. Biol. Macromol.**, v.87, p.237-245, 2016.

GAETANI, GF; GALIANO, S; CANEPA, L; FERRARIS, AM; KIRKMAN, HN. Catalase and glutathione peroxidase are equally active in detoxification of hydrogen peroxide in human erythrocytes. **Blood.**, v.73, p.334-339, 1989.

GARG, R; RAMCHANDANI, AC; MARU, GB. Curcumin decreases 12-O-tetradecanoylphorbol-13acetate-induced protein kinase C translocation to modulate downstream targets in mouse skin. **Carcinogenesis.**, v.29, n.6, p.1249–1257, 2008.

GAUTAM, R; JACHAK, SM. Recent developments in anti-inflammatory natural products. **Med Res Ver.**, v.29, p.767–820, 2009.

GEORGETTI, SR; CASAGRANDE, R; VICENTINI, FTMC; BARACAT, MM; VERRI JR., WA; FONSECA, MJV. Protective Effect of Fermented Soybean Dried Extracts against TPA-Induced Oxidative Stress in Hairless Mice Skin. **Biomed Res Int.**, v.2013, p.8, 2013.

GRESSLER, LT; OLIVEIRA, CB; CORADINI, K; DALLA, RL; GRANDO, TH; BALDISSERA, MD; ZIMMERMANN, CE; SILVA, AS; ALMEIDA, TC; HERMES, CL; WOLKMER, P; SILVA, CB; MOREIRA, KL; BECK, RC; MORESCO, RN; VEIGA, ML; STEFANI, LM; MONTEIRO, SG. Trypanocidal activity of free and nanoencapsulated curcumin on *Trypanosoma evansi*. **Parasitology.**, v.142, n.3, p.48-439, 2015.

GRIS, P; GAUTER, J; CHEN, P; GBSON, DG; GRIS, D; LAUR, O; PIERSON, J; WENTWORTH, L; NACKLEY, AG; MAINEX, W; DIATCHENKO, L. A novel alternatively spliced isoform of mu-opioid receptor: functional antagonism. **Mol. Pain.**, v.6, n.33, p.1-10, 2010.

GOEL, A; BOLAND, CR; CHAUHAN, DP. Specific inhibition of cyclooxygenase-2 (COX-2) expression by dietary curcumin in HT-29 human colon cancer cells. **C Lett.**, v.172, n.2, p.8-111, 2001.

HALLIWELL, B. Biochemistry of oxidative stress. **Biochem Soc Trans.**, v.35, p.1147–1150, 2007.

HEWLINGS, SJ; KALMAN, DS. Curcumin: A Review of Its' Effects on Human Health. **Foods.**, v.6, n.92, p.1-11, 2017.

HISSIN, PJ; HILF, R. A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. **Anal Biochem.**, v.74, n.1, p.214-226, 1976.

JURENKA, JS. Anti-inflammatory properties of curcumin, a major constituent of *Curcuma longa*: a review of preclinical and clinical research. **Altern. Med. Rev.**, v.14, n.2, p.141-153, 2009.

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

KHANSARI, N; SHAKIBA, Y; MAHMOUDI, M. Chronic inflammation and oxidative stress as a major cause of age-related diseases and cancer. **Recent Pat Inflamm Allergy Drug Discov.**, v.3, p.73-80, 2009.

KIUCHI, F; GOTO, Y; SUGIMOTO, N; AKAO, N; KONDO, K; TSUDA, Y. Nematocidal activity of turmeric: synergistic action of curcuminoids. **Chem. Pharm. Bull.**, v.41, n.9, p.1640-1643, 1993.

LEVINE, RL; GARLAND, D; OLIVER, CN; AMICI, A; CLIMENT, I; LENZ, AG; AHN, BW; SHALTIEL, S; STADTMAN, ER. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. **Methods Enzymol.**, v.186, p.464-478, 1990.

LIJU, VB; JEENA, R; KUTTAN, R. An evaluation of antioxidant, anti-inflammatory, and antinociceptive activities of essential oil from *Curcuma longa*. **Indian J. Pharmacol.**, v.43, n.5, p.31-526, 2011.

LOWRY, OH; ROSEBROUGH, NJ; FARR, AL; RANDALL, RJ. Protein measurement with the Folin reagent. **J. Biol. Chem.**, v.193, p.265-275, 1951.

MANIKANDAN, P; SUMINTRA, M; AISHWARYA, S; MANOHAR, BM; LOKANDAM, B; RUVANAKRISHNAM, R. Curcumin modulates free radical quenching in myocardial ischemia in rats. **Int. J. Biochem. Cell Biol.**, v.36, n.10, p.1967-1980, 2004.

MANJU, S; SREENIVASAN, K. Synthesis and Characterization of a Cytotoxic Cationic Polyvinylpyrrolidone–Curcumin Conjugate. **J. pharm. sci.**, v.100, n.2, p.504-511, 2011.

MEGNA, M; NAPOLITANO, M; PATRUNO, C; VILLANI, A; BALATO, A; MONFRECOLA, G; AYALA, F; BALATO, N. Systemic Treatment of Adult Atopic Dermatitis: A Review. **Dermatol Ther (Heidelb)**., v.7, n.1, p.1–23, 2017.

MENON, VP; SUDHEER, AR. Antioxidant and anti-inflammatory properties of curcumin. **Adv Exp Med Biol.**, v.595, p.105–125, 2007.

MORTELLINI, R; FORESTI, R; BASSI, R; GREEN, CJ. Curcumin, an antioxidant and anti-inflammatory agent, induces heme oxygenase1 and protects endothelial cells against oxidative stress. **Free Radic Biol. Med.**, v.28, p.1303-1312, 2000.

MURAKAWA, M; YAMAOKA, K; TANAKA, Y; FUKUDA, Y. Involvement of tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$  in phorbol ester 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA)-induced skin edema in mice. **Biochem. Pharmacol.**, v.71, p.1331–1336, 2006.

PARDO-ANDREU, GL; CAVALHEIRO, RA; DORTA, DJ; NAAL, Z; DELGADO, R; VERCESI, AE; CURTI, C. Fe(III) shifts the mitochondria permeability transition-eliciting capacity of mangiferin to protection of organelle. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v.320, n.2, p.646-653, 2007.

REDDY, AC; LOKESH, BR. Studies on the inhibitory effects of curcumin and eugenol on the formation of reactive oxygen species and the oxidation of ferrous iron. **Mol. and Cel. Bioc.**, v.137, n.1, p.1-8, 1994.

ROCHA, BA; GONÇALVES, OH; LEIMANN, FV; REBECCA, ESW; SILVA-BUZANELLO, RA; FILHO, LC; ARAÚJO, PHH; CUMAN, RKN; BERSANI-AMADO, CA. Curcumin encapsulated in poly-L-lactic acid improves its anti-inflammatory efficacy in vivo. **Adv. Med. Plant. Res.**, v.2, n.4, p.62-73, 2014.

SANTOS, PDF; FRANCISCO, CRL; COQUEIRO, A; LEIMANN, FV; PINELA, J; CALHELHA, RC; INEUA, RP; FERREIRA, ICFR; BONAA, E; GONÇALVES, OH. Nanoencapsulation of curcuminoids extracted from *Curcuma longa* L. and

evaluation of cytotoxic, enzymatic, antioxidant and anti-inflammatory activities. **Food Funct.** 2019.

SCHIANTARELLI, P; CADEL, S; ACERBI, D; PAVESI, L. Antiinflammatory activity and bioavailability of percutaneous piroxicam. **Arzneimittelforschung.**, v.32, n.3, p.230-235, 1982.

SHAO, J; ZHENG, D; JIANG, Z; XU, H; HU, Y; LI, X; LU, X. Curcumin delivery by methoxy polyethylene glycol poly(caprolactone) nanoparticles inhibits the growth of C6 glioma cells. **Acta Biochim Biophys Sin.**, v.43, n.4, p.74-267, 2011.

SINGH, R; SHARMA, P. Hepatoprotective Effect of Curcumin on Lindane-induced Oxidative Stress in Male Wistar Rats. **Toxicol Int.**, v.18, n.2, p.124-129, 2011.

SIQUEIRA, IR; FOCHESSATO, C; TORRES, ILS; DALMAZ, C; NETTO, CA. Agins affects oxidative state in hippocampus, hypothalamus and adrenal glands of Wistar rats. **Life Sci.**, v.78, p.271-278, 2005.

SULTANA, S; SALEEM, M. Salix caprea inhibits skin carcinogenesis in murine skin: inhibition of oxidative stress, ornithine decarboxylase activity and DNA synthesis. **J Ethnopharmacol.**, v.91, n.2-3, p.267-276, 2004.

SUN, M; SU, X; DING, B; HE X; LIU, X; YU, A; LOU, H; ZHAI, G. Advances in nanotechnology-based delivery systems for curcumin. **J. Am. Chem. Soc.**, v.135, p.9099-9110, 2012.

SUN, J; ZHAO, Y; HU, J. Curcumin inhibits imiquimod-induced psoriasis-like inflammation by inhibiting IL-1beta and IL-6 production in mice. **PLoS One.**, v.8, n.6, p.670-678, 2013.

TAYLOR, RA; LEONARD, MC. Curcumin for inflammatory bowel disease: a review of human studies. **Altern. Med. Ver.**, v.16, p.152-156, 2011.

VAUGHN, AR; BRANUM, A; SIVAMANI, RK. Effects of Turmeric (Curcuma longa) on Skin Health: A Systematic Review of the Clinical Evidence. **Phytother Res.**, v.30, n.8, p.1243-1264, 2016.

VERBON, EH; POST, JÁ; BOONSTRA, J. The influence of reactive oxygen species on cell cycle progression in mammalian cells. **Gene.**, v.511, p.1-6, 2012.

ZENG, Y; QIU, F; LIU, Y; QU, G; YAO, X. Isolation and identification of phase I metabolites of demethoxycurcumin in rats. **Drug Metab. Dispos.**, v.35, p.1564-1573, 2007.

ZHONGFA, L; CHIU, M; WANG, J; CHEN, W; YEN, W; FAN-HAVARD, P; YEE, LD; CHAN, KK. Enhancement of curcumin oral absorption and pharmacokinetics of curcuminoids and curcumin metabolites in mice. **C Chem Pharm.**, v.69, n.3, p.89-679, 2012.