

**MARINA FERRARA DE RESENDE**

**ATIVIDADE ANTIOXIDANTE *IN VITRO* E *IN VIVO* DE ANÁLOGOS SINTÉTICOS DA  
CURCUMINA E COMPOSTOS HETEROCÍCLICOS**

Faculdade de Farmácia - UFMG  
Belo Horizonte, MG  
2015

**MARINA FERRARA DE RESENDE**

**ATIVIDADE ANTIOXIDANTE *IN VITRO* E *IN VIVO* DE ANÁLOGOS SINTÉTICOS DA  
CURCUMINA E COMPOSTOS HETEROCÍCLICOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência de Alimentos da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência de Alimentos.

Orientadora: Profa. Renata Adriana Labanca

Coorientadora: Profa. Renata Barbosa de Oliveira

Faculdade de Farmácia - UFMG  
Belo Horizonte, MG  
2015

R433a Resende, Marina Ferrara de  
Atividade antioxidante *in vitro* e *in vivo* de análogos sintéticos da curcumina e compostos heterocíclicos / Marina Ferrara de Resende – 2015.  
94 f.: il.

Orientadora: Renata Adriana Labanca.  
Coorientadora: Renata Barbosa de Oliveira.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos.

1. Diabetes – Tratamento – Teses. 2. Estresse oxidativo – Teses. 3. Antioxidantes – Teses. I. Labanca, Renata Adriana. II. Oliveira, Renata Barbosa de. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Farmácia. IV. Título.

CDD: 616.462

Mestranda: Marina Ferrara de Resende

Orientadora: Profa. Renata Adriana Labanca

Coorientadora: Profa. Renata Barbosa de Oliveira

Linha de Pesquisa do PPGCA:

Qualidade de Alimentos

Área de conhecimento (CNPq/CAPES):

5.07.01.00-2 Ciência de Alimentos



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
Faculdade de Farmácia  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DE ALIMENTOS - PPGCA

**MARINA FERRARA DE RESENDE**

**ATIVIDADE ANTIOXIDANTE *IN VITRO* E *IN VIVO* DE ANÁLOGOS  
SINTÉTICOS DA CURCUMINA E HETEROCICLOS TIAZÓLICOS**

**TESE APROVADA EM 06 DE FEVEREIRO DE 2015**

**COMISSÃO EXAMINADORA**

**Profa. Dra. MARIA BEATRIZ ABREU GLÓRIA**

**Profa. Dra. RENATA ADRIANA LABANCA**  
Orientadora

**Profa. Dra. MIRIAN PEREIRA RODARTE**

**Profa. Dra. RENATA BARBOSA DE OLIVEIRA**  
Coorientadora e Presidente da Comissão

## DEDICATÓRIA

Aos anjos-amigos de Belo Horizonte que me ajudaram nessa caminhada;

Aos meus pais e irmãos de Juiz de Fora por todo apoio, tios e primas de Lagoa  
Santa que me acolheram e se tornaram meu porto seguro;

Ao amigo e amor João Vitor Rettore por ser meu braço direito neste trabalho e na  
vida.

## **AGRADECIMENTOS**

À minha orientadora Profa. Renata Adriana Labanca, por sua disponibilidade, paciência, incentivo, confiança e aprendizado durante esse tempo no Laboratório de Nutrição Experimental;

À minha coorientadora Profa. Renata Barbosa de Oliveira, por todo apoio durante o desenvolvimento do projeto, disponibilidade, sugestões e contribuições essenciais para este trabalho;

Ao CNPq(Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), pela bolsa de estudos concedida;

À Faculdade de Farmácia, pela infraestrutura disponibilizada para a realização desse trabalho;

À Bioclin®, que disponibilizou gratuitamente os reagentes utilizados nesta pesquisa;

Ao companheiro de pesquisa e também mestrando Cleudiomar Inácio Lino, por toda ajuda no entendimento dessa pesquisa, compreensão, paciência e essencial parceria para o desenvolvimento deste trabalho;

À professora Maria Beatriz de Abreu Glória, por ceder gentilmente a curcumina para a realização deste trabalho;

À professora Mirian Pereira Rodarte, por todo conhecimento transmitido durante a graduação que me permitiu conhecer esse mundo da pesquisa em alimentos;

À professora Elaine Maria de Souza-Fagundes, pela parceria na realização de testes de citotoxicidade que permitiram maior clareza acerca das substâncias estudadas;

À minha parceira, Geraldina Zwaal, pelo apoio constante e incondicional, por toda ajuda durante a realização deste trabalho, por todas as caronas, finais de semana e feriados doados ao meu ensaio;

À parceira do Laboratório UPNE, Anne Danieli, pela ajuda oferecida durante o sacrifício dos animais;

Aos professores e companheiros dos laboratórios de Farmacotécnica e Radioisótopos, por manter as portas abertas e auxiliar no empréstimo e uso de equipamentos e pelo modo educado que sempre me atenderam, em especial ao funcionário Vanderli Pacheco da Silva;

Ao Departamento de Produtos Farmacêuticos, por serem solícitos quanto ao empréstimo de materiais e doação de reagentes;

Ao Departamento de Análises Clínicas, em especial à professora Luci Maria Sant'Ana Dusse, pela ajuda, grande simpatia e educação no empréstimo de equipamentos;

Aos profissionais e queridos amigos do Biotério, Maria Adelaide Fernandes e José Batista Viturino, por todo auxílio prestado, pela simpatia e companheirismo;

Aos amigos do Laboratório de Nutrição Experimental e do Laboratório de Bromatologia, pela amizade, simpatia, suporte e parceria, pelo auxílio no empréstimo de materiais;

A todos os pesquisadores, acadêmicos e funcionários da Faculdade de Farmácia, com os quais tive o privilégio de trocar experiências e informações durante esses anos;

À amiga-anjo Hellen Simões, funcionária da biblioteca, pelo apoio, conversas e palavras doces que fizeram a minha caminhada com certeza mais leve;



À companheira de lar Danielle Brumano, grande amiga e grande pessoa, pelos belos sorrisos, noites, passeios e comidas compartilhados;

Ao amigo-irmão Ayslan Barra, também mestrando, pelas conversas e desabafos que tornaram meus dias mais leves e meus almoços mais gostosos;

À minha querida família, pelo amor, segurança, suporte e apoio de todos nessa etapa realizada em uma cidade distante;

Aos meus tios Paulo Roberto Rezende, Vânia Cerqueira Rezende, e às primas Paula Rezende, Ana Luiza Rezende e Juliana Rezende, por terem me acolhido, suportado e amado, me dando segurança e permitindo a realização dessa etapa;

Ao João Vitor Paes Rettore, admirado pesquisador, por todo suporte, ajuda e dias doados à realização deste trabalho, e ao namorado e amigo, pela força e carinho que me fez chegar até aqui.

## RESUMO

Diabetes mellitus é uma doença caracterizada por hiperglicemia crônica, resultando em desequilíbrio metabólico e estresse oxidativo que promove dano tecidual. O aparecimento dessa patologia está altamente relacionado aos hábitos de vida e alimentares da população, sendo de grande interesse a busca por um suplemento alimentar que possa também atuar evitando ou diminuindo alterações oxidativas em indivíduos diabéticos. Com base na conhecida ação antioxidante apresentada pela curcumina, objetivou-se nesse trabalho avaliar, *in vitro*, a atividade antioxidante de uma série de análogos sintéticos da curcumina, bem como de novas estruturas químicas heterocíclicas tiazólicas, e selecionar a substância mais promissora para estudos adicionais *in vivo*. As análises *in vitro* foram feitas pelos métodos ABTS, captura do radical DPPH<sup>•</sup> e Redução de Ferro (FRAP). A partir dos resultados obtidos, um heterociclo tiazólico sintético, RI46, foi selecionado para estudos *in vivo*, considerando potência, facilidade de síntese e baixa citotoxicidade. A curcumina foi utilizada como controle positivo tanto nos ensaios *in vitro* quanto *in vivo*. Nos estudos *in vivo*, foram utilizados os extratos hepáticos de ratos Wistar saudáveis e diabéticos, com análises de determinação da atividade enzimática de SOD, CAT, GPx e GR, e determinação da peroxidação lipídica pelo teste TBARS; no sangue desses animais foram analisados os parâmetros bioquímicos: hemoglobina, colesterol total, colesterol HDL, triglicérides, ALT, AST, fosfatase alcalina, ureia, proteínas totais, creatinina, magnésio, ácido úrico, amilase e albumina. Os resultados foram submetidos à análise de variância ANOVA e as médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Tukey ( $p = 0,05$ ). Não foram detectadas evidências estatísticas de alterações causadas nas enzimas hepáticas e no nível de peroxidação lipídica após tratamento com RI46 ou curcumina, entretanto, esses parâmetros também não estavam alterados quando comparados os grupos controle sem e com diabetes. Por outro lado, com relação aos parâmetros bioquímicos, houve diferenças significativas para ácido úrico, fosfatase alcalina, ALT e ureia, demonstrando um possível papel protetor antioxidante dessas substâncias no fígado e nos rins dos animais diabéticos que poderia estar agindo por outras vias que não as comumente relatadas na literatura.

Palavras-chave: estresse oxidativo; diabetes mellitus; antioxidantes naturais; substâncias sintéticas.

## ABSTRACT

Diabetes mellitus is a chronic disease characterized by hyperglycemia, metabolic imbalance, resulting in oxidative stress that promotes tissue damage. The appearance of this disease is highly related to lifestyle and food of the population, being of great interest to search for a dietary supplement that can also act by preventing or reducing oxidative alterations in diabetic individuals. Based on the known antioxidant action of curcumin, aimed in this work to evaluate the *in vitro* antioxidant activity of a series of synthetic analogs of the curcumin as well as new thiazólicas heterocyclic chemical structures and select the most promising substance for further studies *in vivo*. *In vitro* analyzes were performed by ABTS, radical DPPH' capture and FRAP methods. From the results obtained, a synthetic heterocyclic thiazole, RI46, was selected for *in vivo* studies, considering potency, ease of synthesis and low cytotoxicity. For comparison purposes, curcumin was used as positive control both *in vitro* and *in vivo* studies. In *in vivo* experiments, the liver extracts of healthy and diabetic Wistar rats were used, with analysis to determine the enzymatic activity of SOD, CAT, GPx and GR, and determination of lipid peroxidation by TBARS assay; finally, in the blood of these animals, biochemical parameters: hemoglobin, total cholesterol, HDL cholesterol, triglycerides, ALT, AST, alkaline phosphatase, urea, total protein, creatinine, magnesium, uric acid, and albumin amylase were evaluated. The results were submitted to ANOVA analysis of variance and the treatment means were compared by Tukey test (0.05). With regard to *in vivo* studies, it was not detected statistical evidence of changes caused in liver enzymes and lipid peroxidation, after treatment with RI46 and curcumin, however, these parameters also were not changed between control groups with and without diabetes. On the other hand, concerning on biochemical parameters, it was detected significant differences in uric acid, alkaline phosphatase, ALT, urea, indicating a possible antioxidant protective role of such substances in the liver and kidney of diabetic animals, that could be acting by other means than the commonly reported in the literature.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Alvos dos radicais livres	21
Figura 2 – Processo de peroxidação lipídica, representada pelas etapas de iniciação, propagação e terminação	24
Figura 3 – Estrutura química da estreptozotocina	30
Figura 4 – Mecanismos propostos para toxicidade provocada pela estreptozotocina	31
Figura 5 – Sistema de defesa enzimático	33
Figura 6 – Estrutura química da curcumina, representando o tautomerismo ceto-enólico	37
Figura 7 – Reação do radical DPPH• com um antioxidante (AH), formando o DPPH-H, que causa a descoloração do meio	42
Figura 8 – Redução do ABTS•+ por um antioxidante e sua formação pelo persulfato de potássio	44
Figura 9 – Reação de redução do complexo férrico para um complexo ferroso	45
Figura 10 – Reação entre MDA e TBA, formando um complexo colorido, usado para avaliação da peroxidação lipídica	46
Quadro 1 – Divisão dos animais em grupos estabelecidos para este estudo	54
Figura 11 – Estrutura química dos análogos sintéticos da curcumina	61
Figura 12 – Estruturas químicas das substâncias sintéticas testadas, não relacionadas à estrutura da curcumina	61
Gráfico 1 – Valores obtidos no teste de atividade antioxidante baseado na captura do radical DPPH•	62
Gráfico 2 – Quantidade de antioxidante necessária para diminuir em 50% a concentração inicial do radical DPPH• (IC50)	62
Gráfico 3 – Valores obtidos no teste de atividade antioxidante baseado na captura do radical ABTS	63
Gráfico 4 – Valores obtidos no teste de atividade antioxidante baseado na redução do ferro (FRAP)	63

Gráfico 5 – Valores obtidos nos três testes de atividade antioxidante <i>in vitro</i> baseados na captura do radical DPPH, captura do radical ABTS e redução do ferro (FRAP)	64
Figura 13 – Estrutura química das substâncias com atividade antioxidante mais promissora	66
Gráfico 6 – Evolução da glicemia capilar dos animais ao longo de todo o período de experimento	68
Gráfico 7 – Consumo de ração pelos animais ao longo de todo período experimental	70
Gráfico 8 – Evolução do peso corporal dos animais ao longo de todo período experimental	70

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Glicemia capilar dos animais ao final do experimento (semana 5)	68
Tabela 2 – Valores médios do peso do fígado dos animais de cada grupo dados em relação ao peso corporal total	73
Tabela 3 – Valores obtidos no teste de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) nas amostras hepáticas como avaliação da peroxidação lipídica	74
Tabela 4 – Valores obtidos no teste de proteínas totais em amostras hepáticas	76
Tabela 5 – Valores obtidos na dosagem das enzimas hepáticas CAT, SOD, GPx e GR	76
Tabela 6 – Valores obtidos nos ensaios bioquímicos realizados nas amostras de sangue dos animais	79

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABTS <sup>+</sup>	2,2-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato)
AGEs	<i>advanced glycation end-products</i>
ALT	alanina aminotransferase
ANOVA	análise de variância
AST	aspartato aminotransaminase
ATP	adenosina trifosfato
BHA	butil-hidroxianisol
BHT	butil-hidroxitolueno
CAT	catalase
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CMC	carboximetilcelulose
DM	diabetes mellitus
DMSO	dimetilsulfóxido
DNA	<i>desoxyribunucleic acid</i>
DPPH <sup>•</sup>	2,2-difenil-1-picrilhidrazina
DTPA	ácido dietilenotriaminopentaacético
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
ERNs	espécies reativas de nitrogênio
EROs	espécies reativas de oxigênio
ERs	espécies reativas
EV	endovenosa
FA	fosfatase alcalina
FAFAR	Faculdade de Farmácia
FRAP	<i>ferric reducing antioxidant power</i>
GPx	glutaciona peroxidase
GR ou Grd	glutaciona redutase
GSH	glutaciona reduzida
GSSG	glutaciona oxidada

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS (continua)

HDL	lipoproteína de alta densidade
ICB	Instituto de Ciências Biológicas
IP	intraperitoneal
LDL	lipoproteína de baixa densidade
MDA	malondialdeído
MTT	metilformazan
MUFAs	ácidos graxos monoinsaturados
NAD <sup>+</sup>	nicotinamida adenina dinucleotídeo oxidada
NADP <sup>+</sup>	nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidada
NADPH	nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
OMS	Organização Mundial da Saúde
RLs	radicais livres
RNA	ácido ribonucleico
SFAs	ácidos graxos saturados
SOD	superóxido dismutase
STZ	estreptozotocina
TBA	ácido tiobarbitúrico
TBARS	espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico
TBHQ	<i>terc</i> -butil-hidroquinona
t-BuOOH	t-butil hidroperóxido
TPTZ	tripiridiltriazina
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais



## LISTA DE SÍMBOLOS

${}^+\text{CH}_3$	cátion metila
$\cdot\text{CH}_3$	radical metila
$\cdot\text{OH}$	radical hidroxila
${}^1\text{O}_2$	oxigênio singlete
$-\text{CH}_2-$	grupo metileno
$\text{Fe}^{+2}$	íon ferroso
$\text{Fe}^{+3}$	íon férrico
$\text{H}_2\text{O}_2$	peróxido de hidrogênio
$\text{HO}_2\cdot$	radical hidroperoxila
$\text{HOCl}$	ácido hipocloroso
$\text{L}$	lipídeo
$\text{L}\cdot$	radical lipídico
$\text{LO}\cdot$	radical alcoxila
$\text{LOO}\cdot$	radical peroxila
$\text{LOOH}$	hidroperóxido lipídico
$\text{NO}\cdot$	óxido nítrico
$\text{NO}_2$	dióxido de nitrogênio
$\text{O}_2$	gás oxigênio
$\text{O}_2^{\cdot-}$	ânion superóxido
$-\text{OCH}_3$	grupo metoxila
$\cdot\text{OH}$	ânion hidroxila
$\text{ONOO}^-$	peroxinitrito

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	17
2 REVISÃO DA LITERATURA .....	19
2.1 PROCESSOS OXIDATIVOS.....	19
2.1.1 RADICAIS LIVRES E ESTRESSE OXIDATIVO.....	19
2.1.2 EFEITOS DO ESTRESSE OXIDATIVO NO ORGANISMO .....	20
2.1.2.1 Peroxidação lipídica.....	23
2.1.3 ESTRESSE OXIDATIVO E DIABETES.....	25
2.1.3.1 Modelos experimentais de Diabetes .....	28
2.2 ANTIOXIDANTES .....	31
2.2.1 ENZIMAS ANTIOXIDANTES: A DEFESA ENDÓGENA .....	32
2.2.1.1 Superóxido Dismutase (SOD).....	33
2.2.1.2 Catalase (CAT) .....	34
2.2.1.3 Glutaciona Peroxidase (GPx) e Glutaciona Redutase (GR) .....	34
2.2.2 ANTIOXIDANTES NATURAIS E SINTÉTICOS: A DEFESA EXÓGENA .....	35
2.3 CURCUMINA E SEUS ANÁLOGOS SINTÉTICOS.....	35
2.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	40
2.4.1 MÉTODOS <i>IN VITRO</i> .....	41
2.4.1.1 Método de captura do radical DPPH.....	42
2.4.1.2 Método de captura do radical ABTS .....	43
2.4.1.3 Método de redução do ferro (FRAP).....	44
2.4.2 MÉTODOS <i>IN VIVO</i> .....	45
3 OBJETIVOS .....	48
3.1 OBJETIVO GERAL .....	48
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	48

4 MATERIAL E MÉTODOS .....	50
4.1 OBTENÇÃO DOS ANÁLOGOS DA CURCUMINA E SUBSTÂNCIAS CORRELACIONADAS .....	50
4.2 ENSAIOS <i>IN VITRO</i> .....	50
4.2.1 MÉTODO DE CAPTURA DO RADICAL DPPH' .....	50
4.2.2 MÉTODO DE CAPTURA DO RADICAL ABTS .....	51
4.2.3 MÉTODO DE REDUÇÃO DO FERRO (FRAP).....	52
4.3 ENSAIOS <i>IN VIVO</i> .....	52
4.3.1 PROCEDIMENTO COM OS ANIMAIS.....	53
4.3.2 PREPARO DO HOMOGENATO HEPÁTICO.....	54
4.3.3 AVALIAÇÃO DA PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA PELA FORMAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS REATIVAS AO ÁCIDO TIOBARBITÚRICO (TBARS) .....	55
4.3.4 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE PROTEÍNAS .....	56
4.3.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DE ENZIMAS HEPÁTICAS .....	56
4.3.5.1 Superóxido Dismutase (SOD).....	56
4.3.5.2 Catalase (CAT) .....	57
4.3.5.3 Glutathiona Peroxidase (GPx) .....	57
4.3.5.4 Glutathiona Redutase (GR) .....	58
4.3.6 TESTES BIOQUÍMICOS .....	58
4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	59
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	60
5.1 ENSAIOS <i>IN VITRO</i> .....	60
5.2 ENSAIOS <i>IN VIVO</i> .....	67
5.2.1 PARÂMETROS FISIOLÓGICOS DOS ANIMAIS .....	67
5.2.2 TBARS .....	74
5.2.3 PROTEÍNAS TOTAIS E ATIVIDADE DAS ENZIMAS ANTIOXIDANTES .....	75
5.2.4 PARÂMETROS BIOQUÍMICOS.....	78

CONCLUSÃO.....	82
REFERÊNCIAS.....	84

## 1 INTRODUÇÃO

O organismo humano, por meio de suas funções bioquímicas normais, produz continuamente espécies reativas, contra as quais existe um sistema de defesa antioxidante. Porém, quando há um desequilíbrio, seja pela produção aumentada dessas espécies ou a partir de um decréscimo na rede de defesa, se instala uma condição conhecida por estresse oxidativo. Nessa condição, as espécies reativas geram danos cumulativos a biomoléculas como lipídeos, proteínas e DNA, sendo relacionados a várias doenças crônico-degenerativas como, por exemplo, diabetes mellitus (AK & GÜLÇİN, 2008; CHOI, 2009; SILVA et al., 2011; CAROCHO & FERREIRA, 2013; LÓPEZ-ALARCÓN & DENICOLA, 2013; YADAV et al., 2013).

Diabetes mellitus é uma doença metabólica caracterizada por hiperglicemia crônica, que afeta o metabolismo associado ao estresse oxidativo, levando a sérios problemas de saúde. O aumento dessa doença na população mundial, atribuído não somente ao crescente número de idosos, mas principalmente ao estilo de vida atual, faz com que o diabetes tenha grande impacto nos gastos com a saúde. Torna-se importante, assim, controlar o agravamento dessa doença para diminuir o sofrimento dos pacientes e conter custos sociais (HENRIQUES et al., 2010; WHO, 2014a; WHO, 2014b).

Dessa maneira, tem crescido nos últimos anos o interesse por substâncias antioxidantes, presentes nos alimentos ou sintetizadas a partir destes que sejam eficazes na prevenção do surgimento ou agravamento do diabetes, com o mínimo de efeitos colaterais (HUSSEIN & ABU-ZINADAH, 2010; PRABHAKAR et al., 2013; JEENGER et al. 2014).

Nesse contexto, destaca-se a curcumina, um pigmento amarelo-ouro que é o principal ativo extraído dos rizomas da cúrcuma ou açafrão (*Curcuma longa*), sendo esta planta tradicionalmente utilizada na culinária e na medicina chinesa e indiana (HATCHER et al., 2008; PIRES et al., 2013). A curcumina é amplamente estudada por possuir grande poder antioxidante, podendo ser utilizada como suplemento alimentar para atuar na proteção às biomoléculas, sendo associada à melhora no tratamento de várias doenças (ANAND et al., 2008; VOLP et al., 2009; HONORATO et al., 2013). Apesar de suas importantes propriedades farmacológicas e de seu

excelente perfil de segurança, possui problemas quanto à solubilidade e biodisponibilidade e cor intensa, que impedem seu uso disseminado (ANAND et al., 2007; PRASAD et al., 2014).

Dessa maneira, a busca por novos análogos da curcumina, que sejam mais eficazes e contornem esses problemas para o uso como suplemento alimentar associado à diminuição dos danos gerados pelo estresse oxidativo no diabetes, tem sido alvo de vários estudos com promissores resultados como mostrados neste trabalho (ANAND et al., 2007; ANAND et al., 2008; BHULLAR et al., 2013).

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 PROCESSOS OXIDATIVOS

#### 2.1.1 RADICAIS LIVRES E ESTRESSE OXIDATIVO

Reações bioquímicas que ocorrem em células e organelas do corpo humano são inerentes à manutenção da vida. As leis da natureza ditam que um corpo vai desde a infância até a idade adulta e, finalmente, entra em um estado frágil que leva à morte. O consumo de oxigênio envolvido no processo de respiração, inerente ao crescimento celular, além de outros eventos fisiológicos normais conduzem à geração de moléculas altamente instáveis, conhecidas como espécies reativas (ERs) (CAROCHO & FERREIRA, 2013).

As ERs incluem espécies radicalares (radicais livres) e não radicalares. Os radicais livres (RLs) são átomos, moléculas ou íons com um ou mais elétrons desemparelhados altamente instáveis e reativos. As principais fontes de RLs são as organelas citoplasmáticas que metabolizam o oxigênio e o nitrogênio, gerando grande quantidade de metabólitos (FERREIRA & MATSUBARA, 1997; BARBOSA et al., 2008; CAROCHO & FERREIRA, 2013).

Uma série de ERs de oxigênio (EROs) e nitrogênio (ERNs) são continuamente produzidas pelo organismo. Muitos desses processos formam ERs com efeitos benéficos e importantes, como geração de ATP por meio da cadeia transportadora de elétrons, fertilização de óvulos, ativação de genes e participação em mecanismos de defesa durante processos infecciosos (FERREIRA & MATSUBARA, 1997; BARBOSA et al., 2010). Porém, quando a quantidade dessas espécies está muito elevada, excede as defesas do organismo e gera uma condição conhecida por estresse oxidativo. ERs podem, por exemplo, iniciar facilmente a peroxidação lipídica de membranas celulares e causar danos cruciais a biomoléculas, tais como ácidos nucleicos, lipídeos, proteínas e carboidratos, podendo causar mutações, gerar apoptose de células saudáveis, envelhecimento precoce, alteração da função celular e aparecimento de doenças degenerativas (AK & GÜLÇİN, 2008; CHOI, 2009).

Portanto, o estresse oxidativo pode ser caracterizado como um estado de desequilíbrio entre a produção de ERs e a defesa antioxidante, evidenciando a incapacidade de antioxidantes endógenos em neutralizar o dano oxidativo em alvos biológicos. O excesso de ERs, seja pela produção aumentada dessas espécies ou a partir de um decréscimo de antioxidantes, é capaz de gerar danos cumulativos às biomoléculas e tem sido relacionado com mais de 100 doenças, como doenças do envelhecimento e várias doenças degenerativas (AK & GÜLÇİN, 2008; CHOI, 2009; SILVA et al., 2011; LÓPEZ-ALARCÓN & DENICOLA, 2013).

A maioria das espécies reativas presentes no organismo humano são derivadas do oxigênio, formando as EROs que incluem, entre outros, ânion superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), radical hidroperoxila ( $HO_2^{\cdot}$ ), radical hidroxila ( $\cdot OH$ ), óxido nítrico ( $NO^{\cdot}$ ), e outras espécies não radicalares, como o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), oxigênio singlete ( $^1O_2$ ), ácido hipocloroso ( $HOCl$ ) e peroxinitrito ( $ONOO^{\cdot}$ ) (BARBOSA et al., 2008; CAROCHO & FERREIRA, 2013).

O radical superóxido é formado após a primeira redução do oxigênio e pode causar lesão mesmo sendo considerado o menos reativo. Pela ação da enzima superóxido dismutase (SOD), o ânion superóxido pode ser transformado em peróxido de hidrogênio. Este, por sua vez, se não neutralizado, pode formar o radical hidroxila, considerado o mais reativo. Isso ocorre *via* reação de Haber-Weiss que pode ser catalisada pelo cobre ( $O_2^{\cdot-} + H_2O_2 \rightarrow O_2 + \cdot OH + \cdot OH$ ) ou da reação de Fenton, catalisada por metais de transição como o ferro ( $Fe^{+2} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{+3} + \cdot OH + \cdot OH$ ). Por esses mecanismos, o peróxido de hidrogênio é considerado extremamente deletério, já que participa de reações que produzem  $\cdot OH$ , tem vida longa, e é capaz de atravessar as camadas lipídicas de membranas e reagir com proteínas ligadas ao ferro (FERREIRA & MATSUBARA, 1997; CAROCHO & FERREIRA, 2013; LÓPEZ-ALARCÓN & DENICOLA, 2013).

### 2.1.2 EFEITOS DO ESTRESSE OXIDATIVO NO ORGANISMO

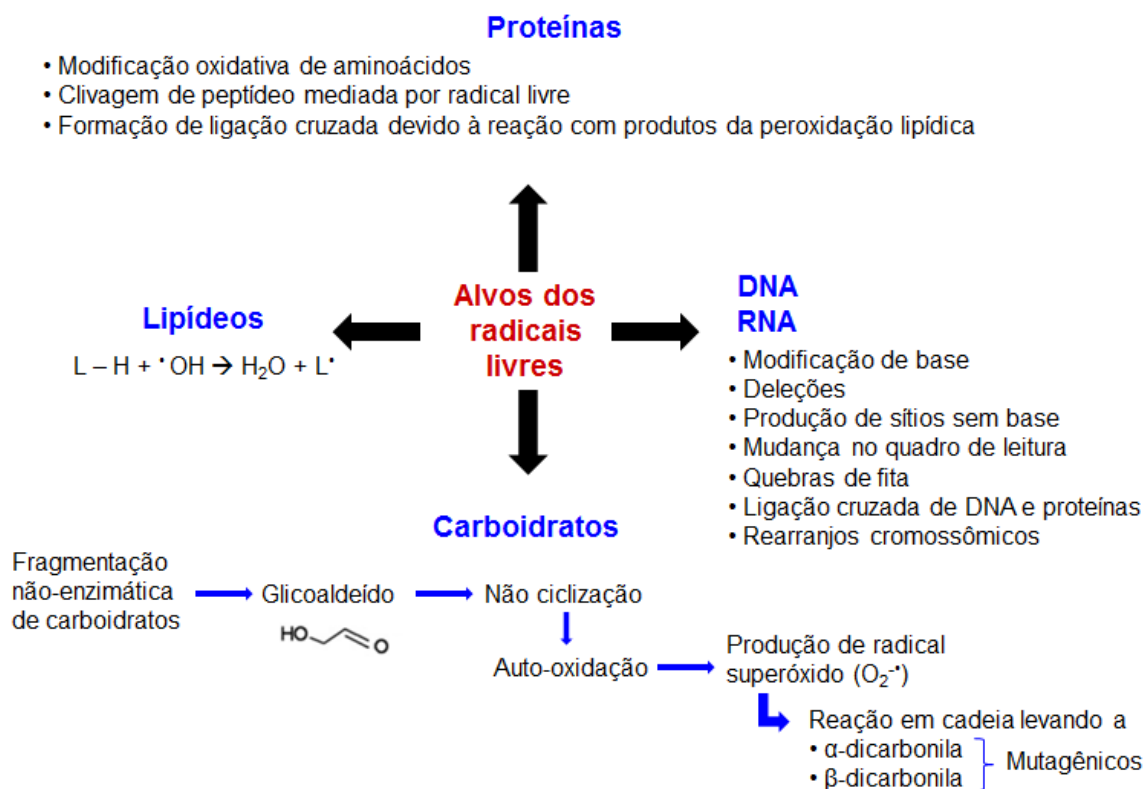
Como mencionado anteriormente, os radicais livres são produzidos como uma parte normal do metabolismo, porém fatores externos também ajudam a promover sua produção, como o consumo de álcool, cigarro e *fastfoods*, poluentes ambientais,



radiação, medicamentos, pesticidas, solventes industriais e ozônio (YADAV et al. 2013; CAROCHO & FERREIRA, 2013).

A formação desses radicais é um processo fisiológico e contínuo que ocorre no citoplasma, nas membranas celulares e nas mitocôndrias (estas são as principais geradoras de radicais livres). Em quantidades baixas ou moderadas, apresentam uma função biológica importante, porém são altamente reativas (NIKI, 2010; CAROCHO & FERREIRA, 2013). Na **Figura 1** podem-se avaliar os principais alvos das EROS, que incluem proteínas, lipídeos, carboidratos, DNA e RNA.

**Figura 1** – Alvos dos radicais livres. Adaptado de CAROCHO & FERREIRA, 2013.



L = lipídeo;  $\cdot OH$  = radical hidroxila;  $L'$  = radical lipídico.

Em relação às proteínas, existem três vias distintas pelas quais podem ser modificadas oxidativamente: modificação de um aminoácido específico, clivagem de peptídeo mediada por radical livre e formação de ligação cruzada devido à reação com produtos da peroxidação lipídica. Tais modificações podem levar à degradação, alteração da estrutura terciária e da funcionalidade, com perda da atividade enzimática (KOHEN & NYSKA, 2002; CAROCHO & FERREIRA, 2013).

O padrão de danos induzidos por radicais livres no DNA pode ser descrito tanto quimicamente quanto estruturalmente da seguinte forma: modificação de base, deleções, produção de sítios sem base, mudança no quadro de leitura, quebras de fita, ligação cruzada de DNA e proteína, e rearranjos cromossômicos. Uma importante reação envolvida com danos no DNA é a produção de radical hidroxila *via* reação de Fenton. Esse radical é conhecido por reagir com todos os componentes da molécula de DNA: as bases purina e pirimidina e o esqueleto desoxirribose-fosfato (HALLIWELL & CHIRICO, 1993; KOHEN & NYSKA, 2002; BARBOSA et al., 2008; CAROCHO & FERREIRA, 2013).

Em relação aos carboidratos, a formação de EROs durante a glicação precoce pode contribuir para danos glicoxidativos. Durante os estágios iniciais da glicosilação enzimática, a fragmentação do açúcar produz espécies de cadeia curta como glicaldeído que não ciclizam e, por conseguinte, são propensas a auto-oxidação, formando o radical superóxido. O resultado da reação em cadeia propagada por este radical é a formação de  $\alpha$  e  $\beta$ -dicarbonilas, que são mutagênicos bem conhecidos (CAROCHO & FERREIRA, 2013).

Quanto aos lipídeos, um ataque de um radical, principalmente pelo  $\cdot\text{OH}$ , na cadeia lateral de um ácido graxo de membranas celulares, a fim de abstrair um átomo de hidrogênio de um carbono metileno, dá início ao processo conhecido como peroxidação lipídica, detalhado mais adiante (HALLIWELL & CHIRICO, 1993; KOHEN & NYSKA, 2002; CAROCHO & FERREIRA, 2013).

Dentre todas essas reações, a peroxidação lipídica merece destaque, pois gera radicais livres que alteram a permeabilidade, fluidez e integridade das membranas celulares, causando danos celulares, e sua quantificação é muito utilizada em testes *in vitro* para avaliação do nível de estresse oxidativo (HALLIWELL & CHIRICO, 1993; BARBOSA et al., 2008, GROTTTO et al., 2009).

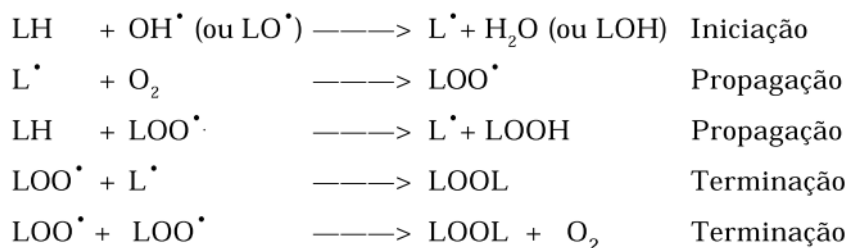
As reações supracitadas levam a produção de ERs, cujo excesso tem sido correlacionado com várias doenças graves como diabetes mellitus e suas complicações, câncer, doenças cardiovasculares - incluindo aterosclerose e mal súbito - desordens neurológicas, renais e hepáticas, hipertensão, artrite reumatóide, síndrome da angústia respiratória do adulto, doenças autoimunes, inflamação, desordens degenerativas associadas com envelhecimento, catarata, obesidade,

autismo, doenças de Alzheimer, Parkinson e Huntington, vasculite, glomerulonefrite, lúpus eritematoso, úlcera gástrica, entre outras (DAI et al., 2009; CAROCHO & FERREIRA, 2013; YADAV et al., 2013).

#### 2.1.2.1 Peroxidação lipídica

A peroxidação lipídica é caracterizada por uma cascata de eventos bioquímicos resultantes da ação de radicais livres sobre os lipídeos insaturados, afetando especialmente as membranas biológicas que são ricas nesses lipídeos. Esse ataque dos RLs permite a formação de radicais lipídicos ( $L^{\bullet}$ ) num processo de iniciação da peroxidação, realizado, principalmente, pelo  $^{\bullet}OH$  ou pelo  $LO^{\bullet}$  (radical alcóxila) (**Figura 2**). A propagação ocorre com a reação dos radicais formados com oxigênio resultando em  $LOO^{\bullet}$  (radical peróxila), que pode reagir com novos lipídeos. Íons ferro podem reagir com hidroperóxidos lipídicos ( $LOOH$ ), formando radicais ( $LO^{\bullet}$  e  $LOO^{\bullet}$ ) que propagam a lipoperoxidação. O processo é finalizado com a reação entre esses radicais, dando origem a compostos não radicalares estáveis (FERREIRA & MATSUBARA, 1997). Quanto mais ligações duplas presentes nos ácido graxos, mais fácil formar um radical, tornando ácidos graxos monoinsaturados (MUFAs) e saturados (SFAs) mais resistentes a radicais que os ácidos graxos poli-insaturados (PUFA) (HALLIWELL & CHIRICO, 1993; CAROCHO & FERREIRA, 2013).

**Figura 2** – Processo de peroxidação lipídica, representada pelas etapas de iniciação, propagação e terminação. Fonte: FERREIRA & MATSUBARA, 1997.



L = lipídeo;  $OH^\bullet$  = radical hidroxila;  $L^\bullet$  = radical lipídico;  $LOO^\bullet$  = radical peroxila;  $LOOH$  = hidroperóxidos lipídicos.

Frequentemente, o radical hidroxila é reconhecido como a espécie iniciadora e mais importante da lipoperoxidação. Outro radical livre potencialmente importante é o dióxido de nitrogênio ( $NO_2$ ) que, atuando na ligação dupla, induz a peroxidação lipídica formando ácidos graxos nitrados e outros produtos contendo nitrogênio (FERREIRA & MATSUBARA, 1997; NIKI, 2010).

Tem sido demonstrado que todo esse processo induz distúrbios de finas estruturas celulares, alteração da integridade, fluidez e permeabilidade de membranas, perda funcional de membranas, modificações em lipoproteínas de baixa densidade (LDL) para formas pró-aterogênicas e pró-inflamatórias, e formação de produtos como o malondialdeído (MDA), fatores estes que podem culminar em morte celular. Além disso, produtos da lipoperoxidação como os compostos carbonilados têm sido citados como mutagênicos, carcinogênicos e indutores de morte celular (FERREIRA & MATSUBARA, 1997; GROTTTO et al., 2009).

Recentemente, os níveis desses produtos em fluidos biológicos e tecidos têm sido estudados extensivamente como potenciais biomarcadores do estresse oxidativo *in vivo* (SOETIKNO et al., 2012). Um dos produtos, o MDA, é considerado um excelente biomarcador da peroxidação lipídica e conseqüentemente do estresse oxidativo (NIKI, 2010; SILVA et al., 2011).

### 2.1.3 ESTRESSE OXIDATIVO E DIABETES

Diabetes mellitus (DM) é uma doença metabólica crônica não transmissível que tem se tornado um problema global devido ao aumento da incidência e prevalência dessa patologia que vem associada a sérias consequências para a saúde humana (MENG et al., 2013; WHO, 2014b). Atualmente existem aproximadamente 347 milhões de pessoas no mundo portadoras de diabetes, e dados mostram que em 2012 essa doença foi a causa direta de 1,5 milhões de mortes. A OMS (Organização Mundial de Saúde) estima que as mortes causadas por diabetes irão dobrar entre os anos de 2005 e 2030, e será a sétima principal causa de morte em 2030 (WHO, 2014b). O Brasil é o oitavo país com maior prevalência dessa doença, que juntamente com a hipertensão, é a enfermidade que mais mata neste país. É também a principal causa de internações por complicações, como doença cardiovascular, diálise por insuficiência renal crônica e amputações de membros inferiores (HENRIQUES et al., 2010; PAHO, 2014).

O crescente aumento dessa doença é atribuído ao envelhecimento da população e principalmente ao estilo de vida atual caracterizado pelo sedentarismo e hábitos alimentares que predispõem ao acúmulo de gordura corporal (HENRIQUES et al., 2010). É fato que complicações diabéticas sempre resultam no aumento da morbidade ou mortalidade entre os seres humanos, fazendo com que o diabetes seja uma das doenças crônicas de maior impacto nos gastos com saúde (PEEYUSH et al., 2009; PAHO, 2014).

O DM é caracterizada por insuficiência na secreção de insulina, hormônio produzido e secretado pelas células  $\beta$  das ilhotas de Langerhans do pâncreas, ou por sensibilidade reduzida dos tecidos a esse hormônio (também conhecida como resistência periférica à insulina), ou a combinação dos dois fatores, resultando assim em hiperglicemia (PRABHAKAR et al., 2013; WHO, 2014b; NAJAFIAN, 2014). Tal distúrbio afeta o metabolismo de carboidratos, proteínas e lipídeos, predispondo os pacientes a sérios problemas de saúde, até mesmo a disfunção de múltiplos órgãos (PRABHAKAR et al., 2013; MENG, LI & CAO, 2013), afetando células  $\beta$ -pancreáticas, fígado, rim, cérebro, coração e outros órgãos (REDDY et al., 2009; AGGARWAL & HARIKUMAR, 2009).

A curto prazo, o DM gera complicações como a cetoacidose diabética e sintomas como visão turva, poliúria (aumento do volume urinário), polidipsia (sede intensa com aumento na ingestão de líquidos), polifagia (aumento do apetite e consequentemente da ingestão alimentar), cetonúria (presença de corpos cetônicos na urina), poliastenia (perda de peso), glicosúria, proteinúria, elevação da uréia urinária e elevação plasmática nos níveis de determinadas enzimas hepáticas. A cetoacidose diabética ocorre pela grande mobilização de ácidos graxos do tecido adiposo (lipólise) seguida da oxidação desses ácidos graxos, disponibilizando moléculas de acetil-CoA que são substratos para a cetogênese hepática. Eventos de hipoglicemia são considerados um efeito adverso do tratamento de diabetes (WHO, 2014c; CHAMPE et al., 2006).

A longo prazo, o diabetes pode apresentar complicações vasculares, como nefropatia, neuropatia e retinopatia, associadas às altas taxas morbidade e mortalidade (SOETIKNO et al., 2012; PRABHAKAR et al., 2013; SOETIKNO et al., 2013; JEENGER et al., 2014). A retinopatia pode levar à cegueira, nefropatia pode resultar em insuficiência renal e neuropatia é associada a úlceras nos pés e amputações. Pacientes com diabetes também têm incidência aumentada de aterosclerose e doenças cardiovasculares, distúrbios endócrinos, alterações nas sensações somáticas que envolvem o córtex cerebral, cerebelo e tálamo levando ao déficit cognitivo e mudanças neurofisiológicas e estruturais (KUMAR et al., 2011; SILVA et al., 2011; PRABHAKAR et al., 2013; WHO, 2014c).

De acordo com a OMS, os tipos mais comuns de diabetes são o tipo 1 e o tipo 2, mas também existem o diabetes gestacional, caracterizado por um estado de hiperglicemia que se desenvolve durante a gravidez, e outros tipos menos comuns gerados por fatores como síndromes genéticas, pancreatite, doenças como fibrose cística, exposição a certos fármacos, vírus e causas desconhecidas (WHO, 2014b).

DM tipo 1 é uma doença geralmente autoimune caracterizada por uma reação inflamatória local dentro e em torno de ilhotas pancreáticas que é seguida por destruição seletiva das células  $\beta$ -secretoras de insulina. Geralmente se desenvolve na infância e adolescência, e os pacientes necessitam de injeções de insulina por toda a vida para a sobrevivência (ARORA et al., 2009; WHO, 2014b).

DM tipo 2 é caracterizada por resistência periférica à insulina e secreção deficiente de insulina. Desenvolve-se geralmente na idade adulta e está relacionada com a obesidade, falta de atividade física e alimentação não saudável. Este é o tipo mais comum de diabetes (que representa 90% dos casos diabéticos em todo o mundo) e o tratamento pode envolver mudanças de estilo de vida e perda de peso por si só, medicação oral ou mesmo injeções de insulina (ARORA et al., 2009; WHO, 2014b).

Tem sido demonstrado que o estresse oxidativo desempenha um papel crítico nas complicações associadas ao DM. Essa forte associação entre DM e estresse oxidativo se deve ao fato da hiperglicemia favorecer a formação de EROs, e algumas propostas para que isso ocorra é por meio da auto-oxidação da glicose, da formação de produtos finais de glicação avançada (AGEs), da via dos polióis e também das mudanças no conteúdo e atividade no sistema de defesas antioxidantes no tecido. Todos esses eventos levam, então, ao dano oxidativo em membranas, rompimento de funções celulares e agravamento da peroxidação lipídica (SILVA et al., 2011; MENG et al., 2013).

A ativação pelo estresse oxidativo de várias vias celulares e episódios inflamatórios resultantes contribuem para o dano endotelial nos capilares sanguíneos dos órgãos, tais como a retina, os neurônios periféricos e rins, levando, respectivamente, a retinopatia, neuropatia e nefropatia, que são complicações bem comuns do DM, já discutidas anteriormente (JEENGER et al., 2014). *In vitro*, já foi observado que EROs causam danos à via de sinalização da insulina, diminuição da translocação dos transportadores de glicose nos adipócitos e redução da internalização da insulina nas células endoteliais (SILVA et al., 2011).

A produção aumentada de EROs durante a hiperglicemia diminui ainda o sistema de defesa antioxidante, que não consegue agir de maneira suficiente contra os radicais livres. Ainda, a oxidação de lipídios e de proteínas está associada ao desenvolvimento das complicações do diabetes (HUSSEIN & ABU-ZINADAH, 2010; SILVA et al., 2011; MENG et al., 2013).

Diante de tais considerações, é importante que os pacientes diabéticos estabeleçam um rigoroso controle da glicemia, uma vez que ainda não existe cura para essa doença. Assim, a intervenção farmacológica se faz necessária, porém os

efeitos colaterais de diversos fármacos hipoglicemiantes já existentes e o desconforto do paciente quanto ao tratamento tem levado vários pesquisadores a buscar, além de novos fármacos e formas de administração, suplementos alimentares que atuem também na prevenção dos danos oxidativos causados pelo diabetes (DEVICICH et al., 2007; ANAND et al., 2008; PRABHAKAR et al., 2013).

Nesta busca por novos suplementos, muitos estudos em modelos experimentais foram e estão sendo feitos para comprovação do benefício de plantas, princípios ativos ou seus derivados sintéticos, em complicações diabéticas (MOHAMMADI et al., 2005; ANAND et al., 2008; JEENGER et al. 2014).

### *2.1.3.1 Modelos experimentais de Diabetes*

Modelos animais de DM são úteis para a análise de possíveis mecanismos que estejam envolvidos na relação entre diabetes e estresse oxidativo. O DM pode alterar a atividade de enzimas antioxidantes em vários tecidos, deprimindo as defesas naturais e expondo o organismo ao estresse oxidativo (SILVA et al., 2011). Os resultados da literatura mostram ainda que além de hiperglicemia, ocorre aumento no plasma de triacilgliceróis e colesterol total, e aumento no fígado e rins de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico. Nestes tecidos, o peso do órgão em proporção ao peso corporal também é aumentado (MARITIM et al., 2003; SILVA et al., 2011).

O diabetes experimental pode ser induzido por fármacos ou manipulação cirúrgica ou genética em várias espécies de animais. A maioria dos experimentos é realizada em roedores, pois além das semelhanças com o diabetes humano, são animais de pequeno porte e fácil manuseio (DELFINO et al., 2002; SILVA et al., 2011).

O modelo mais frequentemente utilizado é a indução química com estreptozotocina (STZ), um fármaco comumente usado para este fim que pode ser administrado tanto por via endovenosa (EV) quanto intraperitoneal (IP). Uma dose média de 50 mg/Kg via IP é suficiente para gerar o quadro de diabetes (DELFINO et al., 2002; ARORA et al., 2009; PEEYUSH et al., 2009; REDDY et al., 2009; HENRIQUES et al., 2010; HUSSEIN & ABU-ZINADAH, 2010; KUMAR et al., 2011;

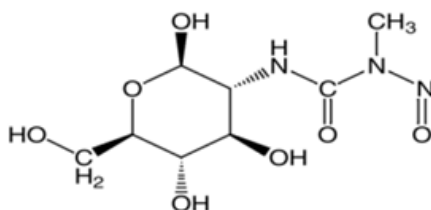


SILVA et al., 2011; GUTTIERRES et al., 2012; SOETIKNO et al., 2012; PRABHAKAR et al., 2013; SOETIKNO et al., 2013; NAJAFIAN, 2014; PALMA et al., 2014; ZHAO et al., 2014).

Inicialmente isolada de colônias da bactéria *Streptomyces achromogenes*, a STZ foi caracterizada como um antimicrobiano de largo espectro. Porém, estudos pré-clínicos revelaram que sua administração endovenosa em altas doses produzia DM em ratos e cães, e que as ilhotas pancreáticas desses animais encontravam-se rompidas, com diminuição ou ausência dos grânulos das células beta (MURATA et al., 1999; DELFINO et al., 2002).

Quimicamente, a estreptozotocina é uma glicosamina-nitrosureia e sua estrutura é formada por uma porção carboidrato, reconhecida pelos transportadores de glicose GLUT-2 presente nas células  $\beta$ , o que permite sua entrada no interior dessas células, e por um grupo *N*-metil-*N*-nitrosureia, citotóxico para as células  $\beta$ -pancreáticas (**Figura 3**) (MURATA et al., 1999; DELFINO et al., 2002; SILVA et al., 2011).

**Figura 3** – Estrutura química da estreptozotocina. Fonte: GUTTIERRES, 2011.

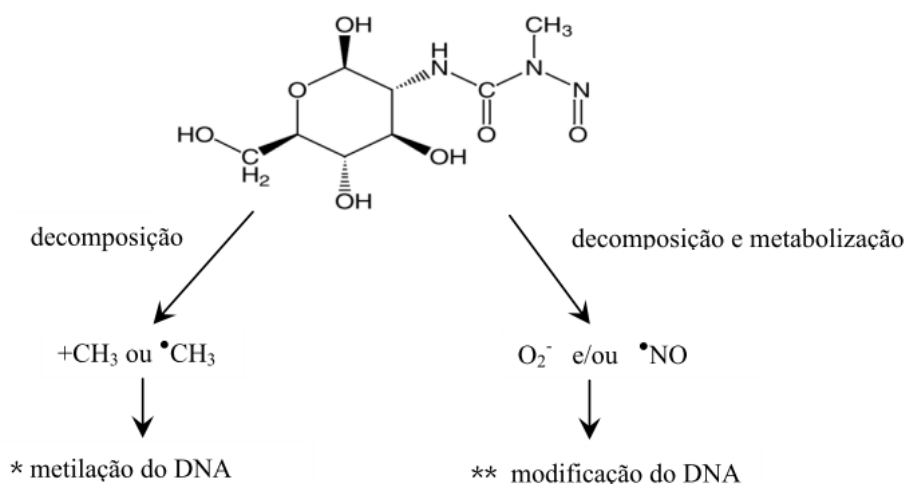


Têm sido propostos mecanismos relacionados ao grupo *N*-metil-*N*-nitrosureia pelos quais a STZ provoca danos em células  $\beta$ -pancreáticas. Sugere-se que este grupo inibe a atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) gerando o acúmulo do radical superóxido e outras espécies tóxicas às células  $\beta$ , o que leva à degradação do DNA nuclear e posterior ativação de uma enzima reparadora de DNA que utiliza como substrato a forma oxidada de nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD<sup>+</sup>). Ocorre então uma rápida depleção de NAD<sup>+</sup> intracelular, provocando a inibição da respiração celular, redução no nível de ATP e da síntese proteica, com consequente queda na síntese e secreção de pró-insulina e perda do balanço iônico celular, levando como consequência à apoptose das células  $\beta$ -pancreáticas (MURATA et al., 1999; SILVA et al., 2011).

Outras propostas de toxicidade sugerem mecanismos associados a radicais livres, onde a STZ atua como um potente agente alquilante. Dessa forma, ela promove a alquilação direta do DNA por adição de radicais metila via decomposição da STZ, induzindo a apoptose nas células  $\beta$  (**Figura 4**). Também é sugerido que a STZ promove a geração de espécies reativas do oxigênio e/ou de nitrogênio, levando ao estresse oxidativo que contribui para a toxicidade na molécula de DNA (MURATA et al., 1999; DELFINO et al., 2002; AGGARWAL & HARIKUMAR, 2009; HUSSEIN & ABU-ZINADAH, 2010; SILVA et al., 2011).

**Figura 4** – Mecanismos propostos para toxicidade provocada pela estreptozotocina.

Fonte: GUTTIERRES, 2011.



\* Metilação do DNA induzida por <sup>+</sup>CH<sub>3</sub>(cátion metila) ou •CH<sub>3</sub>(radical metila).

\*\*Modificação do DNA induzida por espécies reativas de oxigênio e/ou nitrogênio.

## 2.2 ANTIOXIDANTES

Durante o curso da evolução, uma rede de defesa muito eficiente tem se formado para combater o estresse oxidativo, sendo necessários diversos antioxidantes e enzimas com diferentes funções para formar o sistema de defesa *in vivo*. Os antioxidantes podem ser definidos como qualquer substância que atrasa, impede ou elimina os danos oxidativos a uma molécula alvo, gerando compostos com baixa ou nenhuma toxicidade (MAGALHÃES et al., 2008; NIKI, 2010; CAROCHO & FERREIRA, 2013).

Além de localizados em diferentes lugares, intra e extracelulares, os antioxidantes podem agir de diversas formas: inibindo a formação de ERs (antioxidantes preventivos); removendo rapidamente as ERs antes que ataquem moléculas biologicamente essenciais (antioxidantes de eliminação); reparando moléculas já danificadas por radicais livres (antioxidantes de reparação); agindo como redutores que convertem hidroperóxidos em compostos estáveis; como quelantes de metais que convertem os pró-oxidantes metálicos (derivados de ferro e cobre) em produtos estáveis; como inibidores de enzimas pró-oxidantes (lipooxigenases); entre outras formas (NIKI, 2010; CAROCHO & FERREIRA, 2013).

A capacidade e eficácia das substâncias antioxidantes são determinadas não somente por sua estrutura química, mas também por fatores como a reatividade química com os radicais livres, taxa de eliminação de radicais, destino de radical após neutralização (devendo este ser estável), interação com outros antioxidantes (podendo resultar em antioxidação sinérgica), concentração e mobilidade no meio, absorção, distribuição, retenção e metabolismo (ANAND et al., 2008; NIKI, 2010; CAROCHO & FERREIRA, 2013).

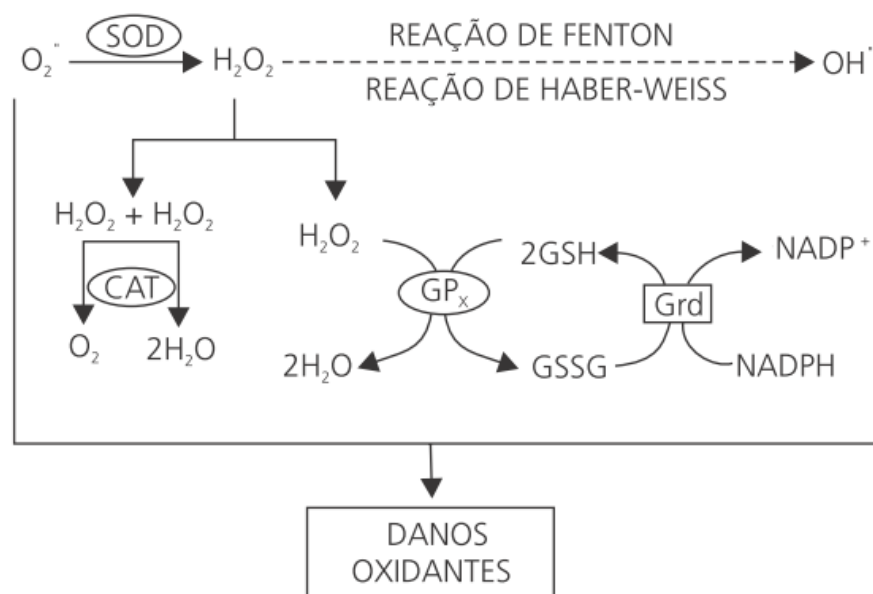
O sistema antioxidante pode ser classificado em enzimático e não-enzimático. O primeiro caso está representado principalmente pelas enzimas antioxidantes endógenas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathiona peroxidase (GPx). Quanto ao sistema antioxidante não-enzimático, este se relaciona a um grupo de antioxidantes que podem ser agrupados em compostos produzidos *in vivo* (endógenos), como glutathiona reduzida, ubiquinona e ácido úrico, e em compostos obtidos diretamente da dieta (exógenos), como vitaminas E, C, beta-caroteno e outros (VASCONCELOS et al., 2007; CAROCHO & FERREIRA, 2013).

Apesar da notável eficiência do sistema antioxidante endógeno, por si só ele não é suficiente quando o estresse oxidativo se instala, por isso, tornam-se necessários vários tipos de antioxidantes presentes na dieta para manter a concentração de radicais livres em baixos níveis (CAROCHO & FERREIRA, 2013).

### 2.2.1 ENZIMAS ANTIOXIDANTES: A DEFESA ENDÓGENA

Como já mencionado, as enzimas antioxidantes fazem parte do sistema de proteção endógeno contra danos oxidativos. São consideradas, em geral, antioxidantes secundários porque não evitam a formação, e sim eliminam os radicais livres já formados antes que reajam e danifiquem os sistemas biológicos. As principais enzimas antioxidantes são a SOD, CAT, GPx GR (glutathiona redutase) (VASCONCELOS et al., 2007; MENG et al., 2013). O sistema de defesa antioxidante dessas enzimas é coordenado como mostrado na **Figura 5** e detalhado a seguir.

**Figura 5** – Sistema de defesa enzimático. Fonte: BARBOSA et al., 2010.



SOD = Superóxido dismutase; CAT = Catalase; GPx = Glutaciona peroxidase; Grd = Glutaciona redutase; GSH = Glutaciona reduzida; GSSG = Glutaciona oxidada.

### 2.2.1.1 Superóxido Dismutase (SOD)

A superóxido dismutase é uma metaloenzima encontrada nas mitocôndrias e no citosol sob três formas distintas de acordo com a presença do cofator metálico no sítio ativo. Ligada ao manganês (Mn-SOD) está presente nas mitocôndrias, e ligada ao cobre e zinco (Cu, Zn-SOD) se encontra no citosol celular e também nas mitocôndrias (PERRY et al., 2010; MILLER, 2012).

A SOD catalisa a conversão do radical superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) a peróxido de hidrogênio por meio de sucessivas oxidações e reduções dos íons metálicos presentes no sítio ativo. O peróxido de hidrogênio será, então, posteriormente capturado e degradado por meio da ação da CAT e da GPx. No estresse oxidativo, as reações de Haber-Weiss e de Fenton estão propensas a acontecer, gerando o radical  $^{\bullet}OH$  altamente reativo, contra o qual não existe defesa enzimática. O radical superóxido interfere também na função das enzimas CAT e GPx, desativando-as e, dessa forma, a SOD contribui, também, protegendo essas enzimas e garantindo sua atividade (SARKHAIL et al., 2007; BARBOSA et al., 2010; MILLER, 2012).

### 2.2.1.2 Catalase (CAT)

A catalase é uma enzima encontrada abundantemente em todos os organismos vivos, porém está em concentração mais elevada no fígado e nos rins. Está localizada predominantemente no peroxissoma, principal organela responsável pela desintoxicação celular (VASCONCELOS et al., 2007; GOYAL & BASAK, 2010).

Essa enzima contém um grupo heme em seu sítio ativo e tem como função catalisar a decomposição do peróxido de hidrogênio a água e oxigênio, inativando essa espécie reativa. As enzimas CAT e GPx agem de forma integrada a fim de impedir o acúmulo de peróxido de hidrogênio e evitar a geração do radical hidroxila, contra o qual não há sistema enzimático de defesa (VASCONCELOS et al., 2007; GOYAL & BASAK, 2010).

### 2.2.1.3 Glutathione Peroxidase (GPx) e Glutathione Redutase (GR)

Peroxidases são enzimas que usam vários doadores de elétrons para reduzir o peróxido de hidrogênio à água, e a principal em vertebrados é a glutathione peroxidase (GPx). Nessas enzimas o átomo de enxofre do aminoácido cisteína é substituído por selênio, originando a seleno-cisteína, o que justifica o seu grande potencial antioxidante (VASCONCELOS et al., 2007; SILVA et al., 2011).

A redução de peróxido de hidrogênio pela glutathione peroxidase é mediada pelo seu substrato, a glutathione reduzida (GSH), a qual é oxidada à forma dissulfeto (GSSG) com consequente redução do peróxido. A glutathione redutase exerce então seu papel de recuperação do sistema, convertendo GSSG novamente a GSH, usando NADPH como cofator. Assim, a coordenação dessas duas enzimas que fazem parte do ciclo da glutathione se mostra um importante mecanismo de defesa do organismo frente às ERs (BARBOSA et al., 2008; SILVA et al., 2011).

Geralmente presentes no citosol e matriz mitocondrial, alguns trabalhos relatam baixa atividade dessas enzimas em doenças relacionadas ao estresse oxidativo. Porém, estudos recentes correlacionam positivamente a elevação da atividade dessas enzimas ao uso de planta medicinal (SARKHAIL et al., 2007), vegetais e frutas (MARTINELLO et al., 2006; ALEZANDRO et al., 2013) com

potencial antioxidante, mostrando assim uma interface entre os dois tipos de defesa (endógena e exógena) contra os danos oxidativos no organismo.

### 2.2.2 ANTIOXIDANTES NATURAIS E SINTÉTICOS: A DEFESA EXÓGENA

Muitas substâncias naturais contidas em alimentos, frutas, bebidas, especiarias e suplementos têm gerado grande interesse entre consumidores e pesquisadores devido à associação de seu frequente uso com a prevenção de desordens que envolvem o estresse oxidativo, como as doenças cardiovasculares, o câncer e o diabetes. Tal fato pode ser parcialmente atribuído à presença de antioxidantes, com destaque para os polifenólicos, substâncias antioxidantes hidrofílicas mais abundantes encontradas nos alimentos. Outras classes de substâncias com essa propriedade podem ser citadas, como os carotenóides e as poliaminas. Os antioxidantes presentes na dieta podem estimular as defesas celulares e ajudar a evitar danos oxidativos (CHOI, 2009; NIKI, 2010; CAROCHO & FERREIRA, 2013; SHARMA et al., 2013).

Os antioxidantes sintéticos, por sua vez, têm sido amplamente utilizados como aditivos alimentares para atuar na proteção contra a degradação oxidativa de alimentos, aumentando sua vida de prateleira. Com esse objetivo, os antioxidantes sintéticos mais utilizados são butil-hidroxianisol (BHA), butil-hidroxitolueno (BHT) e *terc*-butil-hidroquinona (TBHQ) (AK & GÜLÇİN, 2008; CHOI, 2009; CAROCHO & FERREIRA, 2013). Ainda nesse contexto, a curcumina, um antioxidante de origem natural, e também seus derivados sintéticos têm sido sugeridos para uso como suplemento alimentar, atuando como protetores do organismo contra o estresse oxidativo.

### 2.3 CURCUMINA E SEUS ANÁLOGOS SINTÉTICOS

Considerando os danos provocados pelo estresse oxidativo e a busca por fármacos a partir de fontes naturais, a cúrcuma é uma planta largamente estudada por sua capacidade antioxidante, representada por seu princípio ativo mais estudado: a curcumina.

A curcumina é um pigmento de tom amarelado a alaranjado extraído dos rizomas da *Curcuma longa*, uma espécie herbácea e perene da família Zingiberaceae, a mesma do gengibre. O nome do gênero é originário da palavra árabe *kurkum* que significa açafrão, com mais de 70 espécies já identificadas. Originária do sudeste asiático, essa planta foi introduzida no mundo ocidental no século XIV por exploradores europeus, ficando conhecida internacionalmente como *turmeric*, além de possuir diversos nomes populares como açafrão, falso-açafrão, açafrão-da-Índia e gengibre amarelo (SHISHODIA et al., 2007; HATCHER et al., 2008; VOLP et al., 2009; AGGARWAL et al., 2013; PIRES et al., 2013).

A cúrcuma é muito cultivada no sul e sudeste asiático, sendo a Índia considerada o principal país produtor, consumidor e exportador. No Brasil, tal espécie se adaptou bem, cultivada principalmente nos estados de Goiás, Mato Grosso e São Paulo, possuindo desenvolvimento altamente satisfatório e produtividade semelhante à de sua região de origem (FILHO et al., 2000; FILHO et al., 2004; SHISHODIA et al., 2007).

O rizoma da planta é amplamente utilizado na culinária como pigmento e tempero em molhos (curry), produtos de padaria, bolos, tortas, queijo, sorvete, iogurte, picles, mostarda, bebidas, sopas, cereais e coberturas de doces (SHISHODIA et al., 2007; VOLP e al., 2009). Também usada pela indústria de cosméticos, e na forma de cápsulas ou tabletes pela indústria farmacêutica pela sua tradição na medicina chinesa e indiana relacionado aos efeitos benéficos em várias doenças. Seu uso popular tem sido relacionado à prevenção e cura de diversos problemas de saúde como distúrbios biliares, anorexia, tosse, queimaduras, acne, gases, reumatismo, sinusite, infecções comuns do olho, icterícia, várias doenças de pele, doenças hepáticas e feridas diabéticas, além da melhoria do bem-estar geral (FILHO et al., 2000; WEBER et al., 2005; SHISHODIA et al., 2007; HATCHER et al., 2008; VOLP et al., 2009; PRASAD et al., 2014).

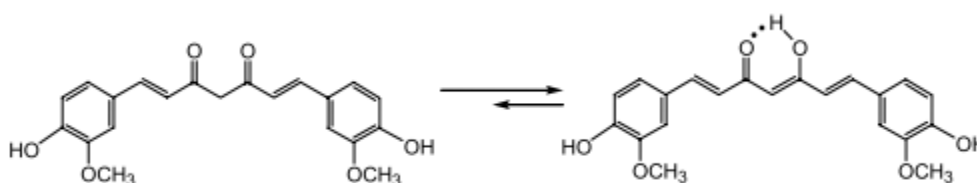
A cúrcuma possui cerca de 235 compostos cujo principal constituinte é a curcumina, com concentração no rizoma seco da planta variando de 2 a 5% (PEREIRA & MOREIRA, 2009; AGGARWAL et al., 2013). Isolada pela primeira vez em 1815 e obtida na forma cristalina em 1870, a curcumina vem sendo amplamente estudada e se destaca por possuir grande poder antioxidante, agindo assim na



proteção de biomoléculas ao diminuir efeitos oxidativos ou aumentar a ação de enzimas antioxidantes. Além disso, também são bem estabelecidas suas atividades anti-inflamatória, antiparasitária, antifúngica, anticarcinogênica, hepato e nefro-protetora, supressora de trombose, hipoglicêmica e antirreumática, existindo assim muitos dados na literatura que reportam grande variedade de atividades farmacológicas por meio de diferentes mecanismos (ANAND et al., 2007; ANAND et al., 2008; VOLP et al., 2009; GUTIERRES et al., 2012).

Quimicamente, a curcumina é o principal representante dos pigmentos curcuminóides, que pertencem à classe diferuloilmetano ( $C_{21}H_{20}O_6$ ). Estruturalmente, é caracterizada como uma molécula de dibenzoil-metano (1,7-bis-(hidroxi-3-metoxifenil)-1,6-heptadieno-3,5-diona), exibindo tautomerismo ceto-enólico com predominância da forma ceto em meio neutro e ácido e da forma enol em meio alcalino (**Figura 6**). Possui três hidrogênios ionizáveis, sendo o hidrogênio enólico mais ácido do que o hidrogênio fenólico. A curcumina apresenta-se mais estável na faixa de pH entre 4 e 7 e em temperaturas de até 100°C. Tal substância é estável à presença de oxigênio, entretanto pode sofrer degradação pela ação da luz. Quanto à solubilidade, esse pigmento é praticamente insolúvel em água e éter, mas solúvel em etanol, dimetilsulfóxido (DMSO) e acetona (FILHO et al., 2000; WEBER et al., 2005; ANAND et al., 2007; SHISHODIA et al., 2007; SINGH et al., 2011).

**Figura 6** – Estrutura química da curcumina, representando o tautomerismo ceto-enólico. Fonte: WEBER et al., 2005.



O grande potencial antioxidante e anti-inflamatório da curcumina faz com que esta seja candidata a estudos para terapia no diabetes por sequestrar ERs em situações de estresse oxidativo e também por impedir a peroxidação lipídica, atuando, portanto, na proteção de biomoléculas (GUTIERRES et al., 2012; PALMA et al., 2014). Acredita-se que as reações com ERs são iniciadas por ambas

hidroxilas fenólica e enólica. No organismo, a curcumina possui vários alvos, ligando-se a metais, albumina e outras moléculas, possibilitando inibição da atividade de enzimas, do crescimento tumoral, da angiogênese, da ativação de fatores de transcrição que regulam a expressão de genes associados ao surgimento de tumores, da inflamação, da angiogênese, entre outros (SINGH et al., 2011; SOETIKNO et al., 2012; MENG et al., 2013; PRASAD et al., 2014).

Os efeitos potencialmente benéficos dessa substância foram verificados em vários estudos utilizando modelos animais diabéticos. O uso da curcumina como tratamento ou parte dele, em diferentes formas de administração, seja solubilizada em extratos etanólicos ou suspensa em soluções de carboximetilcelulose (CMC) ou mesmo em água, apresentou melhoria em diversos parâmetros relacionados ao DM, como redução nos níveis séricos de glicose, hemoglobina glicada, colesterol e triacilgliceróis, proteção das ilhotas pancreáticas, diminuição da lipoproteína de baixa densidade (LDL) e aumento da de alta densidade (HDL), redução da hiperlipidemia, diminuição da atividade sérica das enzimas AST (aspartato aminotransferase) e ALT (alanina aminotransferase), aumento de peso corporal, melhora nas lesões renais, retardo no desenvolvimento de catarata, aumento dos níveis de insulina, redução dos níveis de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) no soro, fígado e rins, prevenção da redução nos níveis de enzimas antioxidantes, entre outros (GUTIERRES et al., 2012; PALMA et al., 2014; MENG et al., 2013; CHUENG SAMARN et al., 2014).

Adicionalmente, a molécula de curcumina possui um excelente perfil de segurança em animais e humanos, sem apresentar toxicidade mesmo em altas doses (superiores a 100 mg/kg/dia), o que juntamente às suas propriedades farmacológicas a torna uma potencial substância para o tratamento de uma variedade de doenças. Por outro lado, apesar de sua eficácia e segurança, tal substância não se mostra um bom agente terapêutico. Sua baixa solubilidade aquosa, baixa biodisponibilidade (baixa absorção, rápido metabolismo e rápida eliminação sistêmica), e cor intensa foram apontados como os principais problemas que impedem que suas propriedades funcionais sejam plenamente exploradas (ANAND et al., 2007; DU et al., 2013; MENG et al., 2013; SHELMA & SHARMA, 2013; PRASAD et al. 2014).

Devido a esses fatos, várias estratégias têm sido avaliadas para a obtenção de análogos da curcumina apresentando eficácia semelhante ou superior e propriedades físico-químicas mais adequadas. A estrutura química da curcumina é determinante para sua atividade biológica e modificações estruturais vêm demonstrando, *in vitro* e *in vivo*, uma possibilidade de modulação de sua biodisponibilidade, com o intuito de elevar seus efeitos biológicos benéficos (SHISHODIA et al., 2005; ANAND et al., 2007; ANAND et al., 2008).

Nesse contexto, vários análogos estruturais da curcumina têm sido sintetizados com intuito de elucidar porções essenciais da molécula para a atividade biológica (grupos farmacofóricos), sendo encontrados análogos com maior e menor atividade biológica quando comparados à curcumina (VENKATESAN & RAO, 2000; ROBINSON et al., 2003; RUKKUMANI et al., 2004; YOUSSEF et al., 2004; SELVAM et al., 2005; WEBER et al. 2005; CHANDRU et al., 2007; TAMVAKOPOULOS et al., 2007; TOMREN et al., 2007; PAE et al., 2008; SUBRAMANIAM et al., 2008; DAI et al., 2009; LEE et al., 2009; ERYANTI et al., 2011; SHANG et al., 2010; SINGH et al., 2011; BHULLAR et al., 2013; DU et al., 2013; LI et al., 2013). Muitos estudos já revelam algumas relações estrutura-atividade, por exemplo, a presença de grupos fenólicos sendo importante para a atividade biológica e antioxidante, aumentadas pela presença de grupos metoxila (-OCH<sub>3</sub>) nos anéis aromáticos (VENKATESAN & RAO, 2000; TOMREN et al., 2007; PAE et al., 2008; SINGH et al., 2011). Eryanti e colaboradores (2011) demonstraram que, em análogos da curcumina contendo um anel ciclopentanona, grupamentos hidroxila e amina em ambos anéis resultam em substâncias com maior atividade antioxidante e anti-inflamatória. Outros estudos mostraram ainda que o grupo metileno (-CH<sub>2</sub>-) central da curcumina é importante para sua atividade antioxidante (WEBER et al., 2005; SHANG et al., 2010).

A avaliação da atividade da curcumina e de análogos demonstrou que eles podem apresentar tanto efeitos antioxidantes como pró-oxidantes. Ahsan e colaboradores (1999) demonstraram que a curcumina e dois derivados curcuminóides foram capazes de degradar o DNA na presença de cobre e gerar espécies reativas de oxigênio, principalmente radical hidroxila. Tal estudo evidenciou efeitos pró-oxidantes e antioxidantes determinados pelo mesmo padrão estrutural dependente do sistema de ensaio utilizado, sendo muitas vezes difícil prever o efeito de tais

substâncias na rede *in vivo*. Portanto, nota-se mais uma vez a necessidade de estudos *in vitro* e *in vivo* para a elucidação dos reais efeitos das substâncias análogas.

Ainda assim, a origem da curcumina a partir de fontes naturais, sua baixa toxicidade, estrutura relativamente simples e vasta gama de propriedades farmacêuticas a torna então uma candidata promissora para uso medicinal, representando um protótipo ideal para modificações e otimizações químicas na busca por novos suplementos alimentares (BHULLAR et al., 2013; DU et al., 2013).

## 2.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

A capacidade antioxidante de compostos complexos como a matriz alimentar, ou de substâncias puras tem sido avaliada em diversos estudos, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, por diferentes métodos (NIKI, 2010; LÓPES-ALARCÓN & DENICOLA, 2013).

A grande diversidade de métodos sob diferentes condições que tem sido aplicados para a avaliação da capacidade e eficácia antioxidante proporciona, muitas vezes, falta de correlação entre as atividades determinadas no mesmo material por diferentes ensaios e entre as atividades determinadas pelo mesmo ensaio em diferentes laboratórios. Isso resulta em parâmetros numéricos difíceis de serem comparados, o que se mostra claramente um empecilho nesse tipo de estudo (MARTÍNEZ-VALVERDE et al., 2000; NIKI, 2010).

Considerando a complexidade do metabolismo no corpo humano, apenas métodos químicos *in vitro* não são suficientes para avaliar as propriedades antioxidantes. Ensaios químicos não consideram parâmetros relevantes envolvidos em ambientes biológicos como a biodisponibilidade, fazendo com que os índices de capacidade antioxidantes obtidos não necessariamente reflitam o que aconteceria *in vivo* (LÓPES-ALARCÓN & DENICOLA, 2013). Para alguns antioxidantes, uma capacidade muito diferente pode ser observada *in vitro* e *in vivo* (NIKI, 2010), tornando necessário que ambos testes sejam feitos.

As vantagens e desvantagens de vários métodos têm sido discutidas quanto à simplicidade, instrumentação necessária, mecanismos, método de quantificação, entre outros. Não existe um método que pode fornecer resultados claros e, por isso,

a melhor solução é usar a associação de vários métodos e uma abordagem de muitas dimensões. Alguns desses procedimentos usam radicais livres ou antioxidantes sintéticos, alguns são específicos para a peroxidação lipídica e tendem a precisar de células animais ou vegetais, alguns têm escopo mais amplo, alguns exigem preparação e conhecimentos mínimos, poucos reagentes e produzem resultados rapidamente (NENADIS et al., 2007; NIKI, 2010; CAROCHO & FERREIRA, 2013).

#### 2.4.1 MÉTODOS *IN VITRO*

Diversos procedimentos *in vitro* para se determinar a atividade antioxidante das amostras de interesse têm sido utilizados, de forma a gerar um resultado rápido e identificar substâncias promissoras. Entretanto, a atividade antioxidante não deve ser determinada com base em apenas um único teste como já discutido (OLIVEIRA et al., 2009; ALAM et al., 2013). Assim, enquanto alguns utilizam o retardo na oxidação como parâmetro da atividade antioxidante, outros analisam a capacidade de eliminação de radical livre e outros, ainda, a redução de íon metálico ou radical cátion (ARNAO et al., 1999). Dessa maneira, torna-se difícil definir os testes mais apropriados, devendo-se optar pelos mais comumente utilizados e aceitos, com base nas informações da literatura (OLIVEIRA et al., 2009).

Considerando esses aspectos, destacam-se os métodos indiretos (reação de oxi-redução entre o oxidante e o antioxidante) como captura do radical DPPH<sup>•</sup> (2,2-difenil-1-picrilhidrazina), captura do radical ABTS<sup>•+</sup> (2,2-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato)) e método FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*), que, com relativa simplicidade, propiciam boa aplicação em rotinas de laboratório (TIVERON, 2010).

A ampla gama de fundamentos, mecanismos de ação e maneiras de expressar resultados traz à tona novamente a difícil comparação total de um método com outro e a comparação de dados a partir de diferentes trabalhos. Diante de tais fatos, torna-se preferível realizar ensaios diferentes e compará-los com antioxidantes sintéticos bem conhecidos, como o BHT ou trolox (análogo sintético da vitamina E), sendo este último bastante usado como composto de referência. A capacidade

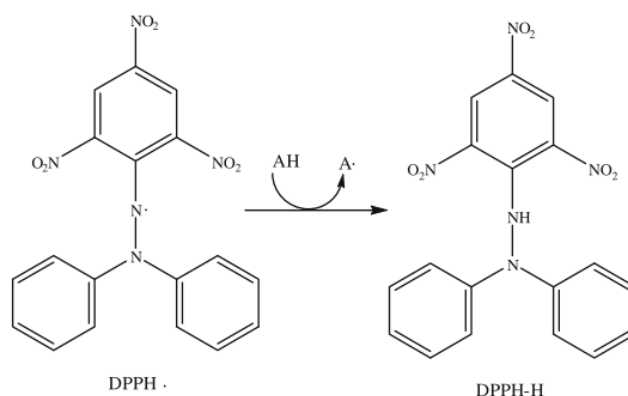
antioxidante pode, então, ser expressa como equivalente em trolox (NIKI, 2010; ALAM et al., 2013).

#### 2.4.1.1 Método de captura do radical DPPH

A molécula de 2,2-difenil-1-picrilhidrazina (DPPH<sup>•</sup>) é um radical livre estável, disponível comercialmente, sendo sua estrutura caracterizada pela presença de um elétron desemparelhado em um átomo de nitrogênio (HUANG et al., 2005; SHARMA & BHAT, 2009).

O método DPPH consiste na medição da redução do DPPH<sup>•</sup> por meio da diminuição na absorvância a 515 – 528 nm por um tempo determinado ou até permanecer constante. O DPPH<sup>•</sup> é um radical de cor violeta intensa, que quando reduzido por substâncias antioxidantes vai adquirindo a cor amarela pálida (**Figura 7**), geralmente em meio orgânico (etanol, metanol) (SHARMA & BHAT, 2009; GÜLÇİN, 2012). O mecanismo da reação é baseado na transferência de elétrons, influenciada pelo solvente e pelo pH do meio (MAGALHÃES et al., 2008).

**Figura 7** – Reação do radical DPPH<sup>•</sup> com um antioxidante (AH), formando o DPPH-H, que causa a descoloração do meio. Fonte: GÜLÇİN, 2012.



Este método, sugerido primeiramente em meados da década de 50, é atualmente um dos mais realizados para verificação da atividade antioxidante. Geralmente os resultados são reportados como EC<sub>50</sub> ou IC<sub>50</sub>, que é a quantidade de antioxidante necessária para reduzir em 50% a concentração inicial de DPPH<sup>•</sup>. Assim, quanto menor o valor da IC<sub>50</sub>, maior é o potencial antioxidante (MAGALHÃES

et al., 2008; DAWIDOWICZ et al., 2012). A principal limitação dessa maneira de apresentação dos resultados é que a porcentagem de radical eliminado é dependente da concentração inicial de DPPH<sup>•</sup>, que varia nos trabalhos (MAGALHÃES et al., 2008).

De forma geral, são utilizados diferentes protocolos, que variam concentração inicial do radical, tempo de reação, entre outros, tornando difícil uma comparação válida entre os resultados encontrados por diferentes autores. Além disso, a estrutura do DPPH<sup>•</sup> pode provocar impedimento estérico para a ação de alguns antioxidantes, e o fato de não ser encontrado nos sistemas biológicos também é criticado. Porém, é um método válido, utilizando um radical estável, que não necessita ser gerado como em outros métodos baseados na neutralização de radicais, e de fácil manuseio para avaliar a atividade antioxidante de substâncias puras ou extratos complexos (HUANG et al., 2005; MAGALHÃES et al., 2008).

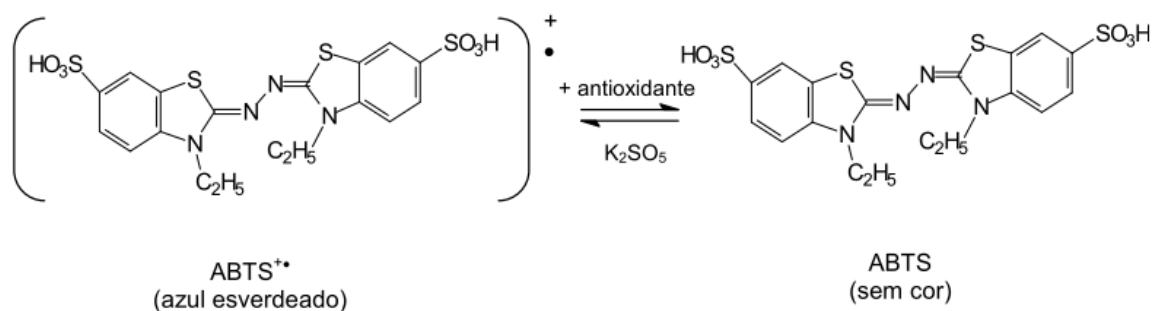
#### *2.4.1.2 Método de captura do radical ABTS*

Primeiramente utilizado por Miller em 1993 para amostras biológicas, o método ABTS se baseia na geração do cátion radical estável 2,2-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato) (ABTS<sup>•+</sup>) de cor esverdeada, com absorção máxima em 414, 645, 734 e 815 nm. A determinação a 734 nm é preferida, visto que neste comprimento de onda a influência de interferentes é reduzida (HUANG et al., 2005; MAGALHÃES et al., 2008).

Inicialmente, o radical ABTS<sup>•+</sup> deve ser gerado por reação química com agentes oxidantes como dióxido de manganês e persulfato de potássio, por reação enzimática usando metamioglobina ou peroxidase, ou por geração eletroquímica (MAGALHÃES et al., 2008). Um dos protocolos mais utilizados envolve a geração do radical pela reação com persulfato de potássio. Em sequência, o radical formado é misturado com a substância ou extrato antioxidante e ocorre a redução do ABTS<sup>•+</sup> a ABTS (**Figura 8**), provocando a descoloração do meio de reação e decréscimo da absorbância, com tempos de reação encontrados na literatura variando de 1 a 30 minutos (MAGALHÃES et al., 2008; PRADO, 2009). Os resultados são comumente expressos em função do trolox submetido às mesmas condições de análise, a partir

da construção de uma curva de calibração com concentrações conhecidas de trolox ou também como porcentagem de inibição do radical (MAGALHÃES et al., 2008).

**Figura 8** – Redução do  $ABTS^{+\bullet}$  por um antioxidante e sua formação pelo persulfato de potássio. Fonte: PRADO, 2009.



O método é relativamente simples, apesar da etapa de formação do radical, permitindo que seja aplicado nas análises rotineiras de laboratório. Além disso, o ABTS apresenta boa solubilidade tanto em água quanto em solvente orgânico, sendo possível a determinação da atividade antioxidante em amostras lipofílicas e hidrofílicas. Apesar dessas vantagens, este ensaio tem sido criticado devido ao radical formado não ser encontrado em sistema biológicos ou representativo de biomoléculas (HUANG et al., 2005; MAGALHÃES et al., 2008).

#### 2.4.1.3 Método de redução do ferro (FRAP)

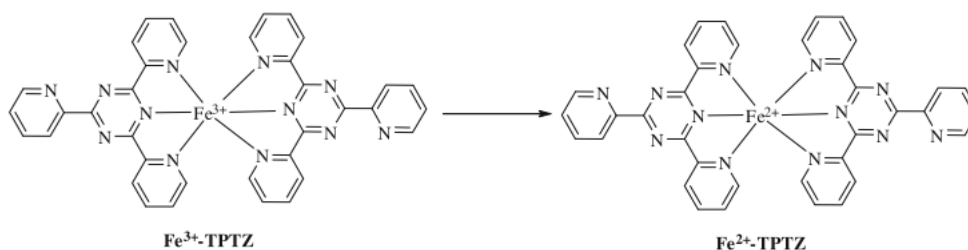
Inicialmente utilizado para medir atividade antioxidante de plasma humano, o método FRAP era denominado como *Ferric reducing ability of plasma* (BENZIE & STRAIN, 1996). Atualmente, ganhou nova denominação de *Ferric Reducing Antioxidant Power* com a ampliação do teste para estudos em alimentos, bebidas, extratos de plantas e substâncias puras (MAGALHÃES et al., 2008).

Esse ensaio mede a habilidade de antioxidantes em reduzirem o complexo férrico tripiridiltriazina  $[\text{Fe(III)}-(\text{TPTZ})_2]^{+3}$  de cor amarelada para um complexo ferroso  $[\text{Fe(II)}-(\text{TPTZ})_2]^{+2}$  apresentando cor azul intensa (**Figura 9**). A reação acontece em meio ácido com absorvância crescente e máxima em 593 nm, sendo a intensidade da cor proporcional a capacidade antioxidante da amostra teste. O tempo de reação



pode variar de segundos até minutos e o resultado é apresentado com base em soluções padrões de ferro ou antioxidante, como ácido ascórbico ou trolox, por meio da construção de curva padrão (MAGALHÃES et al., 2008; GÜLÇİN, 2012).

**Figura 9** – Reação de redução do complexo férrico para um complexo ferroso. Fonte: GÜLÇİN, 2012.



De acordo com Magalhães (2008), esse método, quando adaptado para leitura utilizando microplacas de 96 poços, permite uma melhor reprodutibilidade e menor quantidade de amostra. O ensaio FRAP é simples, barato, porém apresenta limitações como indução de resultados falsamente elevados, tempo de reação (em média 4 minutos) podendo ser insuficiente para determinadas amostras, interferência de outras substâncias causando superestimação do valor FRAP e a possibilidade da geração de radicais no meio de reação, como  $\cdot\text{OH}$  e  $\text{H}_2\text{O}_2$ , devido ao conhecido caráter pró-oxidante do Fe (II) (MAGALHÃES et al., 2008).

#### 2.4.2 MÉTODOS *IN VIVO*

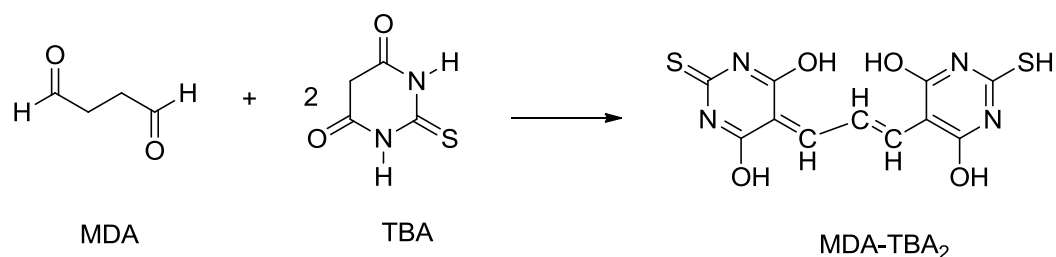
A avaliação da atividade de antioxidantes *in vivo* é de extrema importância pois leva em consideração fatores relativos aos complexos sistemas bioquímicos, como a biodisponibilidade. Após a ingestão, os antioxidantes devem ser absorvidos, transportados, distribuídos e retidos adequadamente nos fluidos biológicos, células e tecidos para que sua ação ocorra de forma satisfatória (NIKI, 2010).

Os vários métodos espectrofotométricos existentes para a determinação do potencial antioxidante *in vivo* continuam a ser amplamente utilizados em diferentes estudos por serem de rápida aplicação, pouca manipulação de material biológico e baixas necessidades instrumentais (BARBOSA et al., 2008; BARBOSA et al., 2010).

Dentre esses métodos, é comum a avaliação da atividade de enzimas envolvidas nos sistemas de defesa antioxidante, que incluem SOD, CAT, GPx e GR (SILVA et al., 2011; PALMA et al., 2014).

Outro teste amplamente utilizado, associado com a capacidade antioxidante, é a avaliação da peroxidação lipídica por meio da formação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). Nesse método ocorre reação do MDA e substâncias relacionadas com o ácido tiobarbitúrico (TBA), formando um complexo colorido que pode ser lido espectrofotometricamente a um comprimento de onda de 532 nm (**Figura 10**). Embora o teste seja inespecífico, uma vez que o ácido tiobarbitúrico não reage somente com o MDA, sua facilidade de execução e baixo custo o tornam frequentemente utilizado (BARBOSA et al., 2008; GROTTTO et al., 2009; PAPASTERGIADIS et al., 2012).

**Figura 10** – Reação entre MDA e TBA, formando um complexo colorido, usado para avaliação da peroxidação lipídica. Fonte: GROTTTO et al., 2009.



MDA = malondialdeído; TBA = ácido tiobarbitúrico.

O efeito das substâncias antioxidantes é avaliado em fluidos biológicos e tecidos, tais como plasma, soro, urina, saliva, lágrima, fluidos cefalorraquidiano e fígado, de humanos e de animais experimentais. Vários biomarcadores de estresse oxidativo têm sido aplicados para medir o nível de oxidação *in vivo*, em diferentes condições e matrizes, e por diferentes métodos (BARBOSA et al., 2010; NIKI, 2010).

Tal diversidade resulta em parâmetros numéricos difíceis de serem comparados, mas é compreensível já que vários mecanismos de reação estão envolvidos no estresse oxidativo no corpo humano. Portanto, não existe um método simples e universal pelo qual a capacidade antioxidante *in vivo* possa ser avaliada com acurácia (NIKI, 2010).

Diversos estudos têm avaliado os efeitos de inúmeros antioxidantes sobre os níveis de biomarcadores de estresse oxidativo em humanos e animais experimentais sob condições normais, de estresse oxidativo e doenças específicas. Alguns estudos confirmaram efeitos positivos dos antioxidantes e outros não, sugerindo-se que a ingestão de antioxidantes não reduz tais biomarcadores em indivíduos saudáveis, mas sim naqueles com aumento do estresse oxidativo ou com doenças relacionadas ao estresse oxidativo (NIKI, 2010). Dessa forma, a utilização de modelos animais em condições de estresse oxidativo, ao invés de modelos de animais saudáveis, se faz muito útil e representativo para avaliação da atividade de substâncias com potencial antioxidante.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Objetivou-se com esse trabalho avaliar potenciais antioxidantes relacionados a análogos sintéticos da curcumina, comparando-os com essa substância com o intuito de identificar novas moléculas, mais eficazes e apresentando melhores propriedades físico-químicas, para uso posterior como suplemento alimentar associado ao estresse oxidativo no diabetes mellitus.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a atividade antioxidante *in vitro* da curcumina e de vinte e nove substâncias de origem sintética, por meio dos métodos de captura do radical ABTS, captura do radical DPPH<sup>•</sup> e método de redução do ferro (FRAP);
- Selecionar a substância sintética mais promissora considerando: atividade antioxidante avaliada *in vitro*, citotoxicidade para células Vero e facilidade de síntese, para a avaliação da atividade antioxidante *in vivo*;
- Avaliar a atividade antioxidante *in vivo* da curcumina e do análogo sintético selecionado, utilizando extratos hepáticos de ratos Wistar saudáveis e diabéticos pela determinação da atividade das enzimas superóxido dismutase, catalase, glutathione peroxidase e glutathione reductase, por espectrofotometria;
- Determinar a peroxidação lipídica pela produção de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), a partir de extratos hepáticos de ratos Wistar saudáveis e diabéticos;
- Avaliar no soro e/ou plasma de ratos Wistar saudáveis e diabéticos os parâmetros bioquímicos triglicérides, colesterol total, colesterol HDL, aspartato aminotransaminase (AST), alanina aminotransaminase (ALT), fosfatase alcalina (FA), proteínas totais,

uréia, globulina, albumina, creatinina, ácido úrico, magnésio e hemoglobina, utilizando Kits Bioclin®.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 OBTENÇÃO DOS ANÁLOGOS DA CURCUMINA E SUBSTÂNCIAS CORRELACIONADAS

Vinte e nove substâncias análogas à curcumina ou não correlacionadas diretamente à estrutura da curcumina foram sintetizadas no Laboratório de Química Farmacêutica da Faculdade de Farmácia (FAFAR) da UFMG pelo mestrando Cleudiomar Inácio Lino, e tiveram sua capacidade antioxidante avaliada *in vitro*. Para fins de comparação utilizou-se a curcumina (Curcumin, SIGMA Aldrich Inc.), gentilmente cedida pela Profa. Maria Beatriz de Abreu Glória do Departamento de Alimentos da FAFAR-UFMG, como controle positivo.

### 4.2 ENSAIOS *IN VITRO*

#### 4.2.1 MÉTODO DE CAPTURA DO RADICAL DPPH<sup>\*</sup>

A capacidade da curcumina e das substâncias sintéticas de sequestrar o radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazina (DPPH<sup>\*</sup>) foi determinada utilizando o método descrito por Lue et al. (2010) com modificações de Bhullar et al. (2013), em microescala e triplicata. Inicialmente, foram preparadas solução de DPPH 0,2 mM e solução de trolox, curcumina e substâncias sintéticas 0,1 mM, todas em DMSO (dimetilsulfóxido). Para a reação, 150 µL da solução de DPPH 0,2 mM e 150 µL das diferentes amostras testes a 0,1 mM foram pipetados para uma microplaca de 96 poços. Controle contendo apenas 300 µL de DMSO e outro contendo 150 µL de solução de DPPH 0,2 mM e 150 µL de DMSO foram incluídos na placa. A microplaca foi então agitada levemente na vertical sobre a bancada e, após 30 minutos em temperatura ambiente ao abrigo da luz, a absorbância foi lida a 515 nm em espectrofotômetro com leitor em microplacas automático (Molecular Devices, VersaMaxProgram, Sunnyvale, California, USA). A porcentagem de DPPH que reagiu foi calculada utilizando a fórmula:

$$\% \text{ Atividade antioxidante} = ((A_{\text{controle}} - A_{\text{teste}}) / A_{\text{controle}}) * 100$$

Onde A = absorvância a 515 nm.

Após essa etapa, calculou-se a IC<sub>50</sub> (concentração necessária para inibição de 50% de radical DPPH) das substâncias que apresentaram porcentagem de atividade antioxidante igual ou superior à da curcumina, assim como a IC<sub>50</sub> da própria curcumina e do trolox. Para o cálculo da IC<sub>50</sub> foram feitas, no mínimo, cinco concentrações igualmente espaçadas da substância teste, com todos os pontos em triplicata. Um gráfico da porcentagem de atividade antioxidante *versus* concentração da amostra teste foi feito e, após confirmadas as premissas de linearidade, calculou-se a IC<sub>50</sub> a partir da equação de linearidade fornecida pela reta.

#### 4.2.2 MÉTODO DE CAPTURA DO RADICAL ABTS

A atividade antioxidante pelo método de captura do radical 2,2-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato) (ABTS<sup>•+</sup>) foi determinada segundo o método descrito por Re et al. (1999) e modificado por Dinkova-Kostova et al. (2007), em microescala e triplicata. Primeiramente, a formação do radical ABTS<sup>•+</sup> se deu pela reação entre persulfato de potássio 24,5 mM (1 mL) e ABTS 70 mM (1 mL) em água destilada (8 mL), mantida por 16 horas ao abrigo da luz. Após esse tempo, a mistura contendo o ABTS<sup>•+</sup> foi diluída em DMSO até absorvância de 0,7 ± 0,02 em 734 nm (diluição de ± 33 vezes).

Para a reação, 20 µL de cada amostra (curcumina e substâncias sintéticas) em concentração de 0,1 mM em DMSO foram adicionados aos poços de uma microplaca de 96 poços, acrescentando-se 180 µL do radical ABTS<sup>•+</sup> diluído. A microplaca foi então agitada levemente na vertical sobre a bancada e após cinco minutos em temperatura ambiente no escuro, leu-se a absorvância a 734 nm em espectrofotômetro com leitor em microplacas automático (Molecular Devices, VersaMaxProgram, Sunnyvale, Califórnia, USA). A quantidade de radical eliminado pelas amostras foi calculada utilizando-se a fórmula que segue, e o resultado expresso em porcentagem de atividade antioxidante.

$$\% \text{ Atividade antioxidante} = ((A_{\text{controle}} - A_{\text{teste}}) / A_{\text{controle}}) * 100$$

Onde A = absorvância a 734 nm.

#### 4.2.3 MÉTODO DE REDUÇÃO DO FERRO (FRAP)

Para avaliação da capacidade antioxidante baseada na redução do ferro foi utilizada a metodologia descrita por Benzie e Strain (1996), com modificações de Rupasinghe et al. (2009) e Bhullar et al. (2013) em triplicata. Inicialmente, o reagente de trabalho pré-aquecido a 37°C foi preparado na proporção de 10:1:1 de tampão acetato 300 mM (pH 3,6), solução de tripiridiltriazina (TPTZ) 10 mM em ácido clorídrico 40 mM e cloreto férrico 20 mM, respectivamente.

Para a reação, 20 µL de cada amostra (curcumina e substâncias sintéticas) em concentração de 0,1 mM em DMSO foram adicionados aos poços de uma microplaca de 96 poços, acrescentando-se 180 µL do reagente de trabalho. Após agitação levemente na vertical sobre a bancada e tempo de reação de 30 minutos em temperatura ambiente ao abrigo da luz, a absorvância foi lida a 593 nm em espectrofotômetro com leitor em microplacas automático (Molecular Devices, VersaMaxProgram, Sunnyvale, Califórnia, USA).

A capacidade antioxidante das substâncias foi calculada por meio da curva padrão de trolox (concentrações de 50, 100, 150, 200, 250, 300 e 350 µM) e o resultado expresso em equivalente ao trolox ou TE, em µM de trolox por 100 µM de amostra.

#### 4.2.4 ESCOLHA DA SUBSTÂNCIA SINTÉTICA MAIS PROMISSORA

Para o teste da atividade antioxidante *in vivo* foi selecionada a substância sintética mais promissora considerando atividade antioxidante *in vitro*, citotoxicidade para células Vero – modelo de células isoladas de rim de macaco (realizado em parceria com a Profa. Elaine Maria de Souza-Fagundes do Departamento de Fisiologia e Bioquímica do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) – UFMG) e facilidade de síntese.

### 4.3 ENSAIOS *IN VIVO*



#### 4.3.1 PROCEDIMENTO COM OS ANIMAIS

O protocolo experimental proposto foi elaborado conforme os Princípios Éticos de Experimentação Animal e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFMG) sob o número 273/2013.

Para avaliação da atividade antioxidante da curcumina e da substância sintética selecionada utilizou-se 48 ratos machos da raça Wistar com aproximadamente 30 dias de idade, peso entre 80 e 170 g, provenientes do biotério da Faculdade de Farmácia, UFMG. Os animais foram alojados individualmente em gaiolas de plástico com dimensões 40,5 cm x 30,8 cm x 16,5 cm, limpas uma vez na semana, com tampa e bebedouro de metal. A temperatura ( $23,6 \pm 1,6$  °C) e a umidade ( $61,6 \pm 8,4\%$ ) da sala de experimentação foram monitoradas e os animais submetidos a ciclo claro/escuro de 12 horas. Durante todo o experimento a ingestão alimentar e o peso corporal foram verificados a cada três dias.

Os animais passaram por um período de aclimação de 11 dias, recebendo ração comercial (*pellets*) e água *ad libitum*. Após este período, foi realizada a indução do diabetes em 40 ratos. Para tal, administrou-se nos animais estreptozotocina (Streptozotocin, SIGMA Aldrich Inc.) diluída em tampão citrato (pH 4,5) na dose de 50mg/kg de peso corporal, via intraperitoneal, após um período de jejum de 12 horas. Nos 8 animais em que o diabetes não foi induzido, administrou-se o veículo tampão citrato (pH 4,5), submetendo os animais ao mesmo estresse da injeção no processo de indução. Decorridos 30 minutos após a injeção, os animais foram alimentados normalmente e receberam uma solução de glicose a 10% via oral como única fonte hídrica durante 24 horas a fim de evitar hipoglicemia fatal, e água sem glicose após este período. Ao término de três dias determinou-se a glicemia capilar e os animais com glicemia de jejum superior a 200mg/dL foram considerados diabéticos e selecionados para o experimento.

Iniciou-se a fase experimental e os animais receberam, além de ração comercial e água *ad libitum*, gavagem de acordo com seu grupo e peso corporal, uma vez ao dia, pela manhã, por um período de 31 dias, utilizando-se carboximetilcelulose (CMC) 0,5% como veículo.

Os 48 animais foram divididos em seis grupos com oito animais cada, como mostrado no **Quadro 1**, no qual as doses da curcumina e da substância RI46 foram escolhidas com base em concentrações comumente encontradas na literatura por apresentarem algum efeito benéfico em sua administração no DM.

**Quadro 1** – Divisão dos animais em grupos estabelecidos para este estudo

<b>Grupos</b>	<b>Tratamento</b>
Controle	Controle sem diabetes, gavagem com CMC 0,5%.
Controle Diab	Controle diabético, gavagem com CMC 0,5%.
Curc 50	Diabético, gavagem com curcumina 50 mg/Kg.
Curc 100	Diabético, gavagem com curcumina 100 mg/Kg.
RI46 50	Diabético, gavagem com RI46 50 mg/Kg.
RI46 100	Diabético, gavagem com RI46 100 mg/Kg.

Ao término do experimento, os animais passaram pelo processo de anestesia seguido por eutanásia. Após jejum de 12 horas foram pesados e anestesiados com injeção intraperitoneal de mistura cetamina 10% e xilazina 2% na proporção 2:1, respectivamente. O sangue foi então coletado em volume aproximado de 6 mL por punção cardíaca para realização dos testes bioquímicos e, para garantir o óbito pós-exsanguinação, foi aplicada uma sobre dose de três vezes a quantidade de anestésico. Em seguida, foi feita uma incisão na linha média do abdômen dos animais com o auxílio de pinça e tesoura, retirando-se o fígado. Tal órgão, após pesado e acondicionado em papel manteiga coberto por papel alumínio, sofreu congelamento rápido em nitrogênio líquido, sendo mantido sob congelamento a -70 °C até a realização das análises previstas.

#### 4.3.2 PREPARO DO HOMOGENATO HEPÁTICO

Para obtenção do homogenato hepático foi utilizado o procedimento descrito por Lima (2008), que consiste na homogeneização de uma alíquota de 1 g de fígado

em 3 mL de tampão fosfato de potássio 0,1 M (pH 7,0), utilizando-se um ultraturrax (Ultra Turrax T25 basic, IKA Labortechnik, Wilmington, North Carolina, USA). O homogeneizado foi centrifugado a 1010 xg por 20 minutos a 4° C e o sobrenadante foi novamente centrifugado a 11200 xg por 20 minutos a 4°C (Heraeus Multifuge X1R Centrifuge, Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA). Parte do sobrenadante obtido nesse último processo foi usada para determinação do TBARS e parte submetida à ultracentrifugação a 105000 xg por 60 minutos a 4°C (Optima L-80 XP Ultracentrífuga, Beckman Coulter, Pasadena, Califórnia, USA). O sobrenadante da ultracentrifugação consiste na fração citosólica do fígado e foi armazenado a -70°C até as análises de determinação do teor de proteína e das enzimas hepáticas antioxidantes.

#### 4.3.3 AVALIAÇÃO DA PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA PELA FORMAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS REATIVAS AO ÁCIDO TIOBARBITÚRICO (TBARS)

Para avaliação da peroxidação lipídica foi utilizado um método baseado em Buege e Aust (1978), em microescala e triplicata. Inicialmente, preparou-se o reagente de trabalho TBARS que consiste na mistura de ácido tricloroacético 15% p/v, ácido tiobarbitúrico 0,375% p/v e HCl 4N. Foram adicionados 500 µL desse reagente de trabalho em *ependorf* contendo 250 µL de amostra do centrifugado de fígado (ver 4.3.2) e, após coberto com papel alumínio, o *ependorf* foi colocado em banho-maria a 100°C por 15 minutos e então resfriado em banho de gelo. Em seguida, foram adicionados 750 µL de butanol e a mistura foi agitada em vórtex cuidadosamente. Após centrifugação a 6169 xg por 10 min, 200 µL do sobrenadante foram colocados em microplaca de 96 poços e a leitura realizada a 530 nm em espectrofotômetro com leitor em microplacas automático (Molecular Devices, VersaMaxProgram, Sunnyvale, Califórnia, USA). Uma curva padrão foi preparada usando-se MDA (concentrações de 10, 20, 30, 40, 50 e 60 µM), e pela interpolação das absorbâncias das amostras hepáticas na equação da reta calculou-se a dosagem de TBARS, expressa em µM de MDA por grama de fígado.

#### 4.3.4 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE PROTEÍNAS

Todas as unidades de medida dos ensaios enzimáticos utilizam como denominador a quantidade em massa de proteína, sendo esta determinada nas amostras pelo método de Bradford (1976), adaptado para microescala. A determinação foi realizada em microescala e triplicata, colocando-se em cada poço da microplaca 5  $\mu$ L do homogenato hepático, 95  $\mu$ L de água deionizada e 150  $\mu$ L do Reagente de Bradford. A placa foi então agitada levemente por 5 segundos e deixada em repouso por 5 minutos antes da leitura a 595 nm em espectrofotômetro com leitor em microplacas automático (Molecular Devices, VersaMaxProgram, Sunnyvale, Califórnia, USA). Uma curva padrão foi preparada usando-se albumina bovina sérica (BSA) (concentrações de 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 3,5 mg/mL), e pela interpolação das absorvâncias das amostras hepáticas na equação da reta calculou-se o teor de proteínas totais, expresso em porcentagem (% - grama de proteína por 100 gramas de fígado).

#### 4.3.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DE ENZIMAS HEPÁTICAS

##### 4.3.5.1 *Superóxido Dismutase (SOD)*

A atividade da SOD foi determinada com base no método proposto por Marklund e Marklund (1974), com modificações, no qual é medida a inibição da auto-oxidação do fenol pirogalol. O teste foi realizado em microescala e triplicata, com a adição, em cada poço da microplaca, de 30  $\mu$ L de amostra de homogenato hepático, 99  $\mu$ L de tampão fosfato 50 mM (pH 7,0), 6  $\mu$ L de MTT (metilformazan) 1,25 mM e 15  $\mu$ L de pirogalol 100  $\mu$ M. Para o padrão, adicionaram-se em cada poço 129  $\mu$ L do tampão, 6  $\mu$ L do MTT e 15  $\mu$ L do pirogalol, e para o branco foram adicionados 144  $\mu$ L do tampão e 6  $\mu$ L do MTT. A microplaca foi, então, incubada em estufa por 5 minutos a 37°C e em seguida adicionaram-se em todos os poços, inclusive no branco, 150  $\mu$ L de DMSO para parar a reação. A leitura foi realizada a 570 nm em espectrofotômetro com leitor em microplacas automático (Molecular Devices, VersaMaxProgram, Sunnyvale, Califórnia, USA). O resultado foi expresso como

unidade de SOD por miligrama de proteína (U de SOD/mg de proteína), sendo 1U relacionada com a auto-oxidação do pirogalol dada pelo padrão.

#### 4.3.5.2 *Catalase (CAT)*

Para determinar a atividade da catalase (CAT) foi utilizado um método baseado em Aebi (1984), em triplicata. Previamente, uma alíquota de 60  $\mu\text{L}$  de peróxido de hidrogênio 35% foi diluída com água deionizada em volume final de 100 mL. Para o preparo do meio de reação, foram misturados em um frasco âmbar 90 mL da diluição anterior, 5 mL de tampão Tris 1M EDTA 5mM (pH 8,0) e 4 mL de água deionizada. O homogenato hepático foi diluído, pipetando-se 20  $\mu\text{L}$  em 380  $\mu\text{L}$  de tampão fosfato 0,1 M (pH 7,0). Foram pipetados 100  $\mu\text{L}$  do homogenato hepático diluído e 2,90 mL de meio de reação, transferidos para uma cubeta de quartzo e realizou-se a leitura imediatamente (tempo zero minuto) e após um minuto a 240 nm em espectrofotômetro com leitor em microplacas automático (Molecular Devices, VersaMaxProgram, Sunnyvale, California, USA). O espectrofotômetro foi zerado com meio de reação e a diferença entre a absorbância no tempo um minuto e zero minuto gera o resultado expresso como  $\Delta E$ . O resultado final da atividade da catalase foi expresso em unidades arbitrárias, como  $\Delta E \times \text{min}^{-1} \times \text{g}^{-1}$  de proteína.

#### 4.3.5.3 *Glutathione Peroxidase (GPx)*

A atividade da GPx foi avaliada segundo Flohé e Gunzler (1984) com modificações. O teste foi realizado em microescala e triplicata, preparando-se inicialmente 50 mL de meio de reação que consiste em 25 mL de tampão fosfato 0,1 M (pH 7,0), 8,6 mg de NADPH, 10 mL de DTPA 0,005 M, 24 mg de GSH, 3,8 mL de GR 5U e 15 mL de água deionizada. Em cada poço da microplaca foram adicionados 2,5  $\mu\text{L}$  de amostra de homogenato hepático, 2,5  $\mu\text{L}$  de t-BuOOH e 250  $\mu\text{L}$  do meio de reação. Para leitura do branco, a amostra foi substituída por água deionizada. Após rápida e leve agitação da placa foi realizada a leitura no tempo zero e após um minuto a 340 nm em espectrofotômetro com leitor em microplacas automático (Molecular Devices, VersaMaxProgram, Sunnyvale, Califórnia, USA). O

resultado da atividade de GPx foi expresso em unidades arbitrárias, como  $\Delta E \times \text{min}^{-1} \times \text{g}^{-1}$  de proteína.

#### 4.3.5.4 *Glutathione Redutase (GR)*

Para a avaliação da atividade da GR foi utilizado o método descrito por Carlberg e Mannervick (1975) com modificações. O teste foi realizado em microescala e triplicata. O meio de reação de volume final 30 mL consistiu em 15 mL de tampão fosfato 0,1 M (pH 7,0), 5,1 mg de NADPH, 19,8 mg de GSSG e 9 mL de água deionizada. Em cada poço da microplaca foram adicionados 10  $\mu\text{L}$  de amostra de homogenato hepático e 190  $\mu\text{L}$  de meio de reação, realizando-se a leitura no tempo zero e após um minuto a 340 nm em espectrofotômetro com leitor em microplacas automático (Molecular Devices, VersaMaxProgram, Sunnyvale, Califórnia, USA). O resultado da atividade de GR foi expresso em unidades arbitrárias, como  $\Delta E \times \text{min}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$  de proteína.

#### 4.3.6 TESTES BIOQUÍMICOS

Os testes foram realizados com os seis grupos para avaliar o efeito da administração da curcumina e de seu análogo sintético sobre parâmetros bioquímicos dos ratos. O sangue coletado, como descrito no item 4.3.1, foi transferido para tubos com e sem anticoagulante EDTA para separação do plasma e do soro, respectivamente, sendo então centrifugado a 1542 xg, durante 15 minutos.

Para este fim, utilizaram-se Kits de diagnóstico padronizados Bioclin® (Bioclin – Quibasa Química Básica Ltda) para as avaliações espectrofotométricas (Espectrofotômetro UV/Vis AJX-1900, Micronal S.A., São Paulo, São Paulo, Brasil) dos seguintes parâmetros bioquímicos: ácido úrico, alanina aminotransaminase (ALT), albumina, amilase, aspartato aminotransaminase (AST), colesterol total, creatinina, colesterol HDL, fosfatase alcalina (FA), hemoglobina, magnésio, proteínas totais, triglicérides e ureia. Em tais determinações os Kits foram utilizados conforme especificações do fabricante.

#### 4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

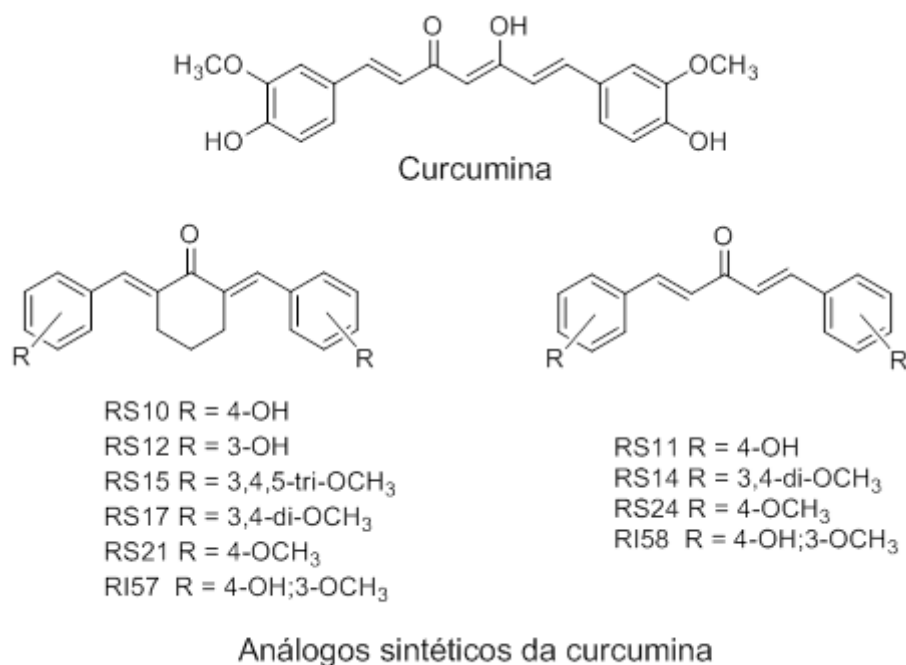
Após a retirada de valores *outliers* pelo teste de Grubbs foi realizada a comparação das médias pela análise de variância (ANOVA). Nas análises com diferença estatística significativa entre as médias por ANOVA, seguiu-se a comparação das médias pelo teste de diferença de médias de Tukey, com 95% de significância.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 ENSAIOS *IN VITRO*

Para avaliação do potencial antioxidante de análogos da curcumina, 10 substâncias sintéticas foram selecionadas para os testes iniciais *in vitro*. A primeira classe de substâncias selecionadas apresenta maior similaridade química em relação à estrutura da curcumina (**Figura 11**).

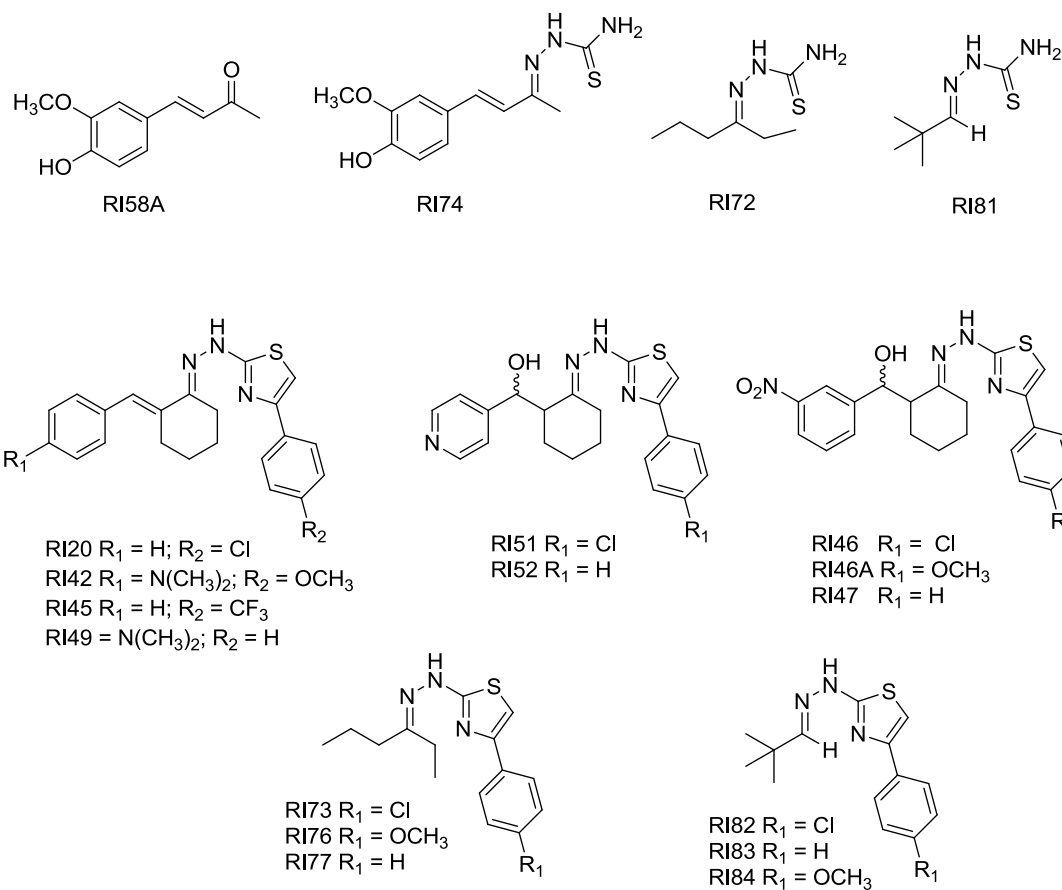
**Figura 11** – Estrutura química dos análogos sintéticos da curcumina.



Para fins de comparação e na busca por novas estruturas químicas com atividade antioxidante promissora, foi realizada, também, uma triagem utilizando dezenove substâncias com maior diversidade estrutural, não correlacionadas diretamente à estrutura da curcumina, conforme ilustrado na **Figura 12**.

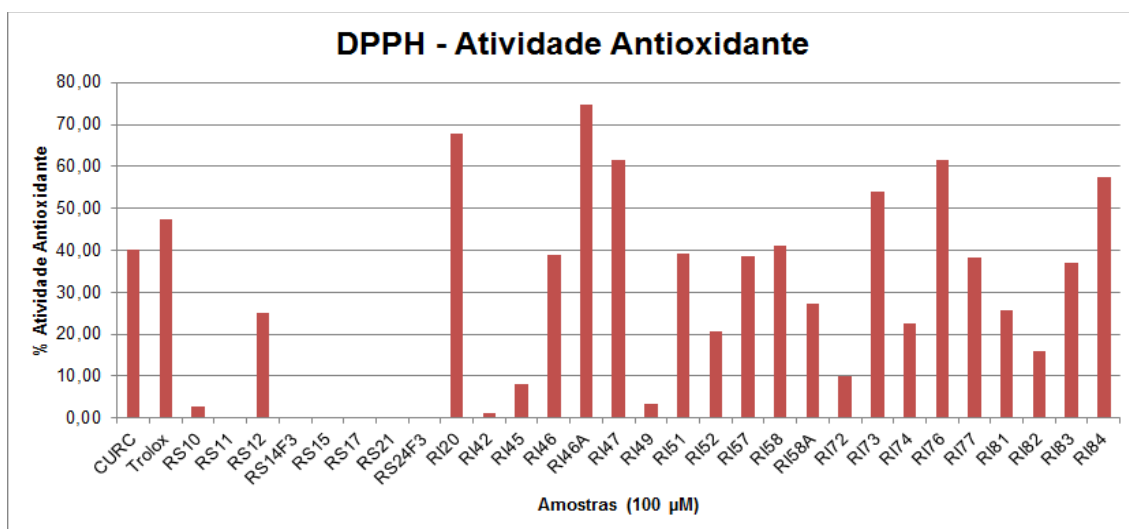
**Figura 12** – Estruturas químicas das substâncias sintéticas testadas, não relacionadas à estrutura da curcumina.



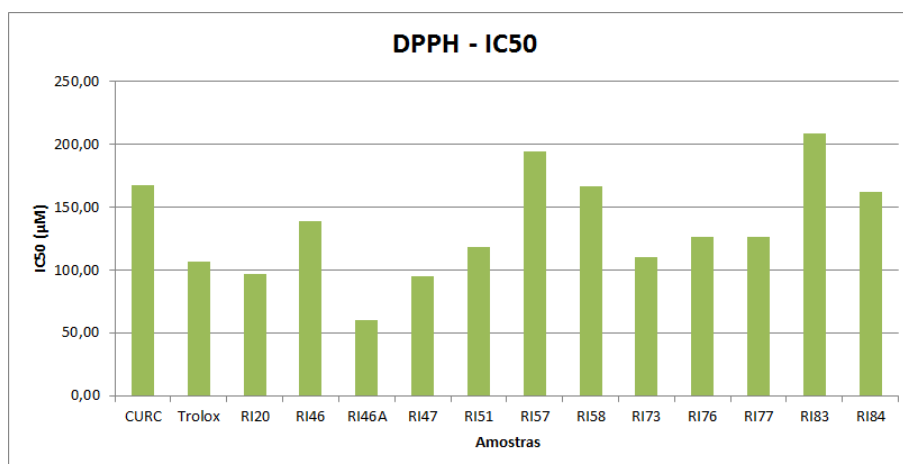


Nos gráficos a seguir são mostrados os resultados para os ensaios DPPH, ABTS e FRAP feitos com o antioxidante sintético trolox, a curcumina e as substâncias sintéticas como indicativo do potencial antioxidante *in vitro*. Em todos os testes foram usadas substâncias na concentração de 100  $\mu M$ , e no teste DPPH calculou-se ainda, posteriormente, a  $IC_{50}$  das substâncias com resultado da atividade antioxidante igual ou superior ao da curcumina.

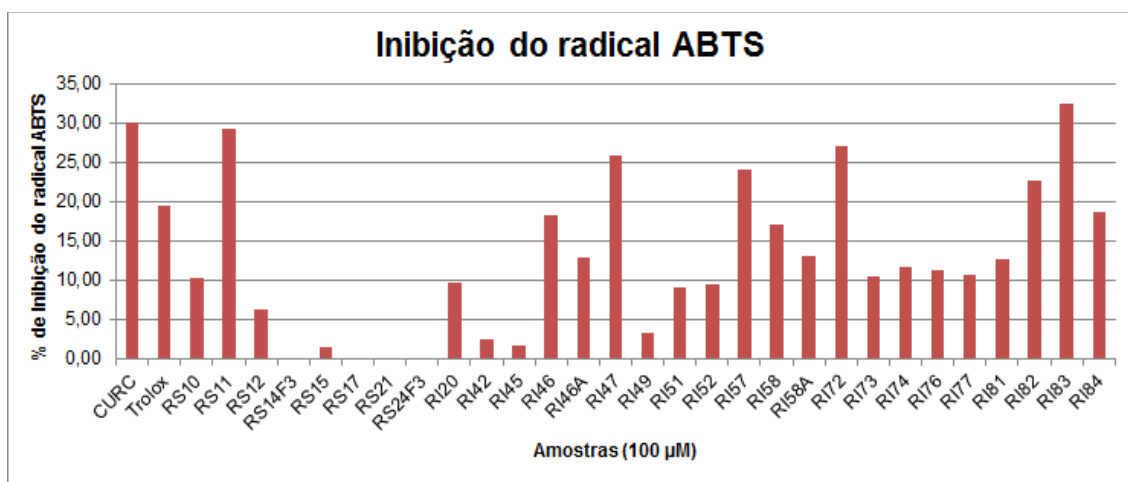
**Gráfico 1** – Valores obtidos no teste de atividade antioxidante baseado na captura do radical DPPH.



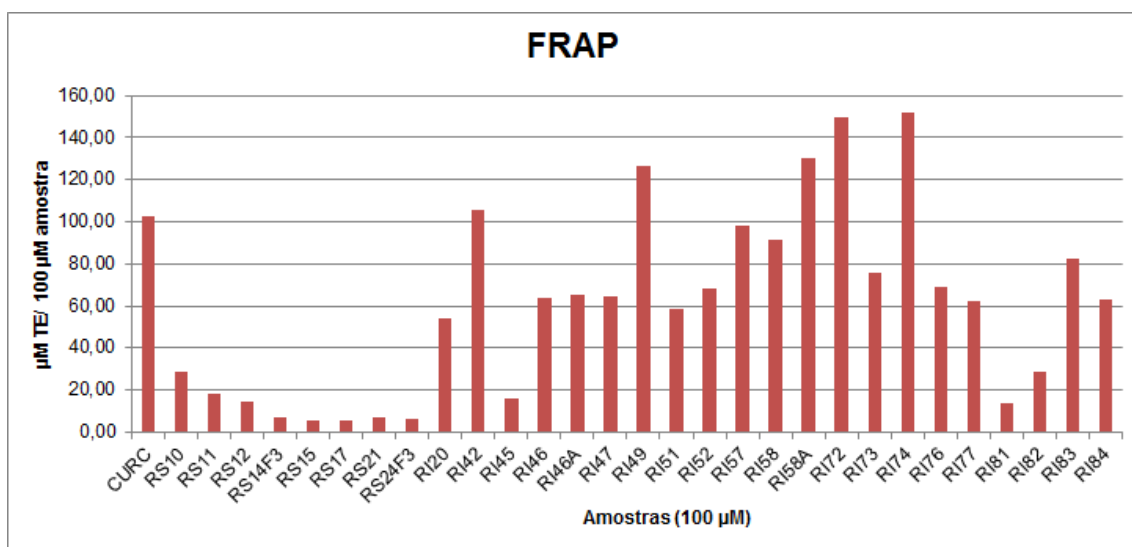
**Gráfico 2** – Quantidade de antioxidante necessária para diminuir em 50% a concentração inicial do radical DPPH (IC<sub>50</sub>).



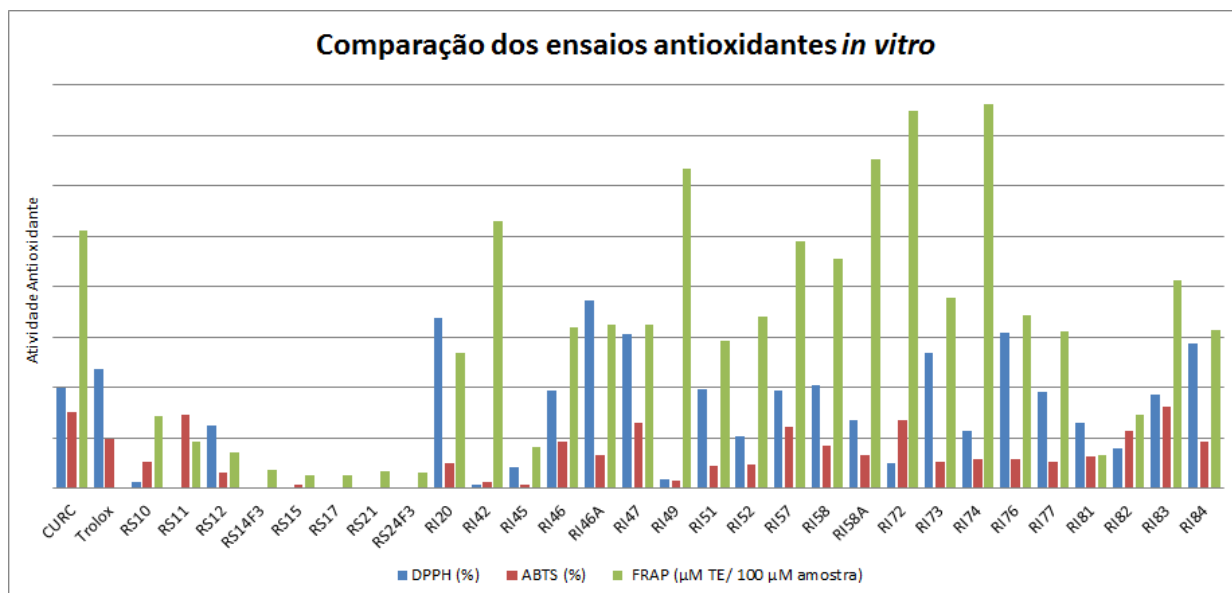
**Gráfico 3** – Valores obtidos no teste de atividade antioxidante baseado na captura do radical ABTS.



**Gráfico 4** – Valores obtidos no teste de atividade antioxidante baseado na redução do ferro (FRAP).



**Gráfico 5** – Valores obtidos nos três testes de atividade antioxidante *in vitro* baseados na captura do radical DPPH, captura do radical ABTS e redução do ferro (FRAP).



Conforme mostrado no **Gráfico 1**, no teste de avaliação da atividade antioxidante pelo método do DPPH, a curcumina apresentou menor capacidade de captura desse radical ( $40,10 \pm 1,36\%$ ) quando comparada ao trolox ( $47,43 \pm 1,48\%$ ). O inverso ocorreu no ensaio ABTS, onde a curcumina ( $30,18 \pm 2,01\%$ ) apresentou melhores resultados que o trolox ( $19,51 \pm 0,98\%$ ) (Gráfico 3). No teste de redução do ferro, 100 µM de curcumina foram equivalentes a 102,55 µM de trolox, evidenciando uma capacidade antioxidante levemente superior da curcumina (**Gráfico 4**).

Em todos os testes é possível observar que várias substâncias sintéticas apresentaram atividade superior à do protótipo curcumina.

No caso do teste DPPH, seis substâncias (RI20, RI46A, RI47, RI73, RI76 e RI84) apresentaram atividade superior e outras seis (RI46, RI51, RI57, RI58, RI77 e RI83) apresentaram atividade similar à da curcumina (**Gráfico 1**).

Em relação aos valores de  $IC_{50}$  calculados, quanto menor for este valor, menor a quantidade de substância será necessária para consumir metade do radical DPPH, e, portanto, melhor atividade antioxidante. Dessa forma, dez substâncias apresentaram  $IC_{50}$  menor que a curcumina ( $IC_{50} = 167,7 \mu\text{M}$ ), sendo, portanto, mais

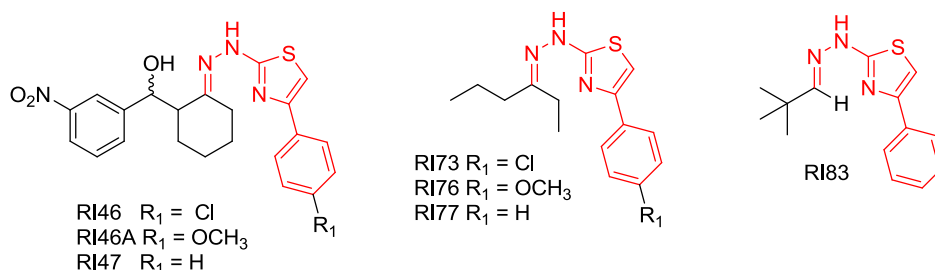
ativas (**Gráfico 2**): RI46A ( $IC_{50} = 60,3 \mu M$ ), RI47 ( $IC_{50} = 95,4 \mu M$ ), RI20 ( $IC_{50} = 97,1 \mu M$ ), RI73 ( $IC_{50} = 110,6 \mu M$ ), RI51 ( $IC_{50} = 118,8 \mu M$ ), RI77 ( $IC_{50} = 126,0 \mu M$ ), RI76 ( $IC_{50} = 126,6 \mu M$ ), RI46 ( $IC_{50} = 139,2 \mu M$ ), RI84 ( $IC_{50} = 162,1 \mu M$ ), RI58 ( $IC_{50} = 166,9 \mu M$ ). É interessante observar que somente duas dessas substâncias (RI57 e RI58) apresentam estrutura química análoga à curcumina. As demais substâncias ativas têm em comum a presença de um anel heterocíclico do tipo tiazólico (vide **Figuras 11 e 12**), demonstrando o potencial antioxidante de uma nova classe de substâncias.

No teste ABTS, quatro substâncias sintéticas apresentaram atividade comparável à da curcumina (RS11, RI47, RI72 e RI83), sendo a RI83 a mais ativa (**Gráfico 3**). A substância RS11, análoga à curcumina (**Figura 11**), apresentou elevada atividade antioxidante ( $29,38 \pm 1,12\%$ ) muito similar à curcumina ( $30,18 \pm 2,02\%$ ), porém, não apresentou atividade no ensaio DPPH.

No ensaio FRAP, cinco substâncias (RI42, RI49, RI58A, RI72 e RI74) foram mais potentes que a curcumina (**Gráfico 4**). Nesse ensaio, as substâncias RI57 e RI58 apresentaram atividade próxima à da curcumina, o que está de acordo com a semelhança estrutural que há entre elas.

Não houve uma substância cuja atividade antioxidante se destacasse nos três ensaios (**Gráfico 5**). Entretanto, a substância RI83 apresentou atividade significativa em dois ensaios, DPPH e ABTS, e moderada no ensaio FRAP, sendo considerada, assim, como uma das mais promissoras. Além da RI83, as substâncias RI46, RI46A, RI47, RI73, RI76 e RI77 também apresentaram atividade boa a moderada em, no mínimo, dois ensaios. Com base na estrutura das sete substâncias selecionadas, pode-se observar que todas elas apresentam uma característica em comum: a presença de uma estrutura básica destacada em vermelho na **Figura 13**.

**Figura 13** – Estrutura química das substâncias com atividade antioxidante mais promissora.



Conforme descrito anteriormente, nenhum dos análogos sintéticos da curcumina foram selecionados, já que não apresentaram atividade antioxidante tão significativa nos três ensaios realizados. A triagem inicial utilizando uma diversidade estrutural maior foi importante, portanto, para a identificação fortuita dessa nova classe de compostos, cuja atividade antioxidante ainda não se encontra descrita na literatura.

Essas substâncias foram, assim, selecionadas para estudos adicionais relacionados à citotoxicidade contra células normais (modelo de células isoladas de rim de macaco – células Vero) e viabilidade sintética em maior escala (1 a 10 gramas).

No ensaio de citotoxicidade, realizado sob a coordenação da Profa. Elaine Maria de Souza-Fagundes do ICB-UFMG, a substância RI73 foi capaz de inibir em 80% a proliferação de células Vero, na concentração de 100  $\mu$ M. As demais substâncias foram inativas nessa concentração, demonstrando, portanto, baixa toxicidade (0% de inibição). A curcumina foi testada para fins de comparação e inibiu 19% da proliferação celular a 100  $\mu$ M.

Considerando o custo dos reagentes, tempo e rendimento de reação, associado aos resultados de atividade antioxidante dos três testes *in vitro* e baixa citotoxicidade em células Vero, a molécula sintética escolhida para os testes *in vivo* foi a RI46. Esses fatores, considerados em conjunto, tornam essa molécula a melhor candidata dentre as estudadas para o uso no modelo animal de diabetes mellitus.

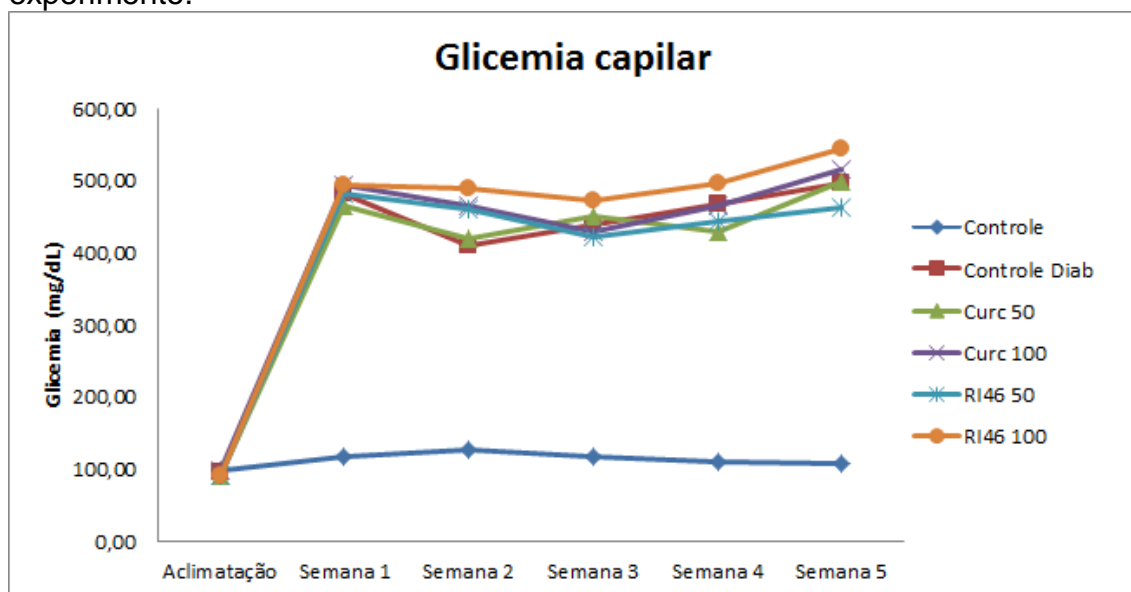
## 5.2 ENSAIOS *IN VIVO*

### 5.2.1 PARÂMETROS FISIOLÓGICOS DOS ANIMAIS

Para avaliação da atividade antioxidante *in vivo* da molécula sintética escolhida em comparação com a curcumina, foi realizada, inicialmente, a indução do DM em 40 ratos pela administração intraperitoneal de STZ. Após três dias, verificou-se a glicemia capilar dos animais em jejum e resultados acima de 200 mg/dL foram considerados diabéticos. Após divisão dos animais em seis grupos (controle sem diabetes, controle diabético, diabético e gavagem com curcumina 50 mg/Kg, diabético e gavagem com curcumina 100 mg/Kg, diabético e gavagem com RI46 50 mg/Kg, diabético e gavagem com RI46 100 mg/Kg), iniciou-se a fase experimental, quando os animais passaram a receber gavagem de acordo com seu grupo e peso corporal uma vez ao dia, pela manhã, durante 31 dias usando-se CMC 0,5% como veículo.

Os valores da glicemia capilar média obtidos no início do ensaio animal, após a indução do DM com STZ e durante todo o período de gavagem estão apresentados no **Gráfico 6**. Na **Tabela 1** é mostrada a análise estatística dos níveis glicêmicos na última semana do experimento a fim de avaliar o real efeito dos tratamentos.

**Gráfico 6** – Evolução da glicemia capilar dos animais ao longo de todo o período de experimento.



Controle = grupo controle sem diabetes; Controle Diab = grupo controle diabético; Curc 50 = grupo diabético tratado com curcumina 50 mg/Kg; Curc 100 = grupo diabético tratado com curcumina 100 mg/Kg; RI46 50 = grupo diabético tratado com RI46 50 mg/Kg; RI46 100 = grupo diabético tratado com RI46 100 mg/Kg.

**Tabela 1** – Glicemia capilar dos animais ao final do experimento (semana 5).

Grupo	Glicemia capilar (mg/dL) ± D.P.
Controle	106,63 ± 6,76 <sup>b</sup>
Controle Diab	496,86 ± 102,00 <sup>a</sup>
Curc 50	499,00 ± 92,39 <sup>a</sup>
Curc 100	514,86 ± 80,90 <sup>a</sup>
RI46 50	462,17 ± 73,86 <sup>a</sup>
RI46 100	543,67 ± 51,69 <sup>a</sup>

Médias ± desvio padrão seguidas por letras distintas na coluna diferem entre si pelo teste de Tukey, com 95% de confiança. Controle = grupo controle sem diabetes; Controle Diab = grupo controle diabético; Curc 50 = grupo diabético tratado com curcumina 50 mg/Kg; Curc 100 = grupo diabético tratado com curcumina 100 mg/Kg; RI46 50 = grupo diabético tratado com RI46 50 mg/Kg; RI46 100 = grupo diabético tratado com RI46 100 mg/Kg.

Todos os grupos experimentais apresentaram valores médios iniciais de glicemia dentro da faixa de normalidade (em torno de 95 mg/dL), assim como observado por Kumar e colaboradores (2011), Najafian (2014) e Palma e colaboradores (2014) cujas glicemias dos grupos de ratos normais foram em torno de 85, 105 e 86 mg/dL, respectivamente. Após três dias da indução do diabetes, o grupo controle sem diabetes, submetido ao mesmo estresse da injeção pela administração do veículo tampão citrato (pH 4,5) durante o processo de indução,



manteve níveis de glicemia normais, semelhantes aos medidos no período pré-indução. Já os grupos submetidos à administração de STZ na dose de 50 mg/Kg, tiveram aumento significativo da glicemia (em torno de 480 mg/dL), caracterizando-os como diabéticos. A hiperglicemia crônica, característica encontrada nos grupos diabéticos tratados ou não, é resultado da falha na produção ou no efeito da insulina que leva a anormalidades no metabolismo de carboidratos, proteínas e lipídeos (PRABHAKAR et al., 2013).

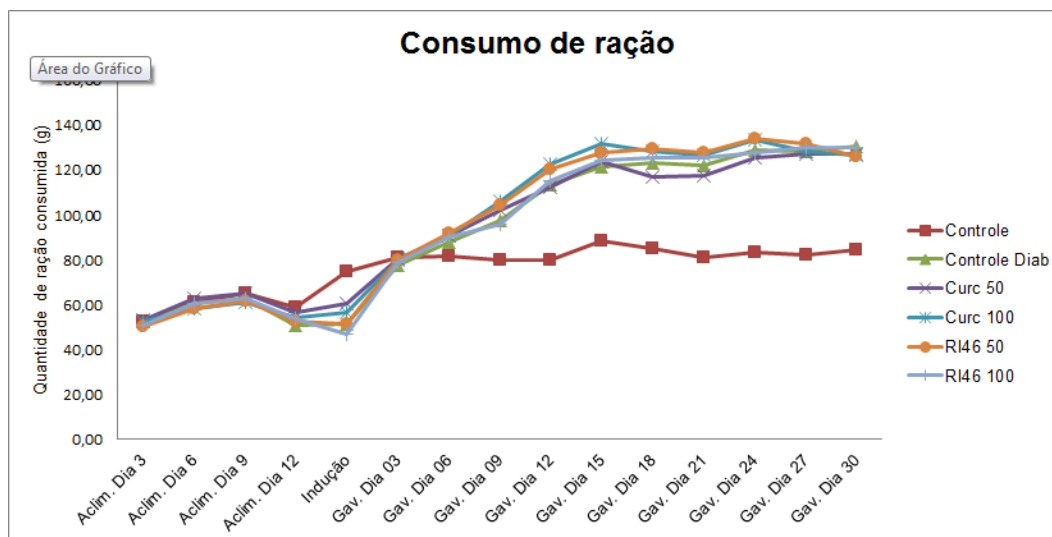
Ao final do experimento, observou-se que a glicemia do grupo controle sem diabetes manteve níveis normais, diferentemente dos animais diabéticos tratados ou não. O tratamento com curcumina e RI46 não apresentou mudanças no perfil glicêmico alterado de ratos diabéticos. Esse resultado pode ser decorrente, em parte, das elevadas taxas glicêmicas devido ao comprometimento na produção de insulina e cujo controle requer inclusão de insulina no tratamento.

Os resultados encontrados neste trabalho estão em acordo com os achados de Zhao e colaboradores (2014), que administraram dose de 200 mg/Kg de curcumina em ratos diabéticos por 14 dias, e Suryanarayana e colaboradores (2007), que incorporaram curcumina a 0,01 e 0,002% da dieta de ratos diabéticos por 8 semanas. Ambos não observaram mudança no perfil glicêmico de ratos tratados com curcumina quando comparados ao grupo diabético sem tratamento.

Por outro lado, Peeyush e colaboradores (2009) (tratamento: curcumina 60 mg/Kg por 14 dias), Hussein e Abu-Zinadah (2010) (tratamento: curcumina 80 mg/Kg por 7 semanas), Kumar e colaboradores (2011) (tratamento: curcumina 60 mg/Kg por 14 dias), Soetikno e colaboradores (2012 e 2013) (tratamento: curcumina 100 mg/Kg por 8 semanas), Najafian (2014) (tratamento: curcumina 80 mg/Kg por 30 dias) e Palma e colaboradores (2014) (tratamento: curcumina 60 mg/Kg por 30 dias), todos estudos com ratos, observaram que o tratamento com curcumina influenciou a glicemia, com diminuição dos valores glicêmicos nestes trabalhos variando de 2,4 a 45,2% quando comparado ao grupo diabético sem tratamento, em contraste com os resultados encontrados nesse trabalho.

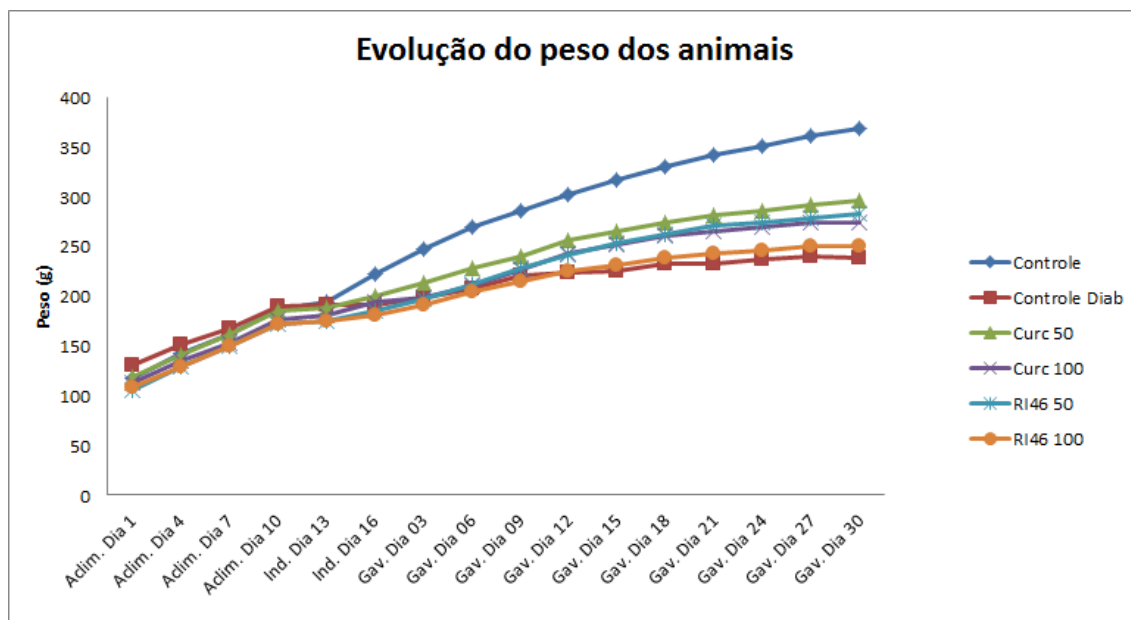
O consumo médio de ração de cada grupo e a evolução do peso médio dos animais foram avaliados a cada três dias durante todo o ensaio e os valores obtidos estão apresentados nos **Gráficos 7 e 8**.

**Gráfico 7 – Consumo de ração pelos animais ao longo de todo período experimental.**



Aclim. =Período de aclimação, aferição do consumo de ração nos dias indicados; Gav. =Período de gavagem, aferição do consumo de ração nos dias indicados. Controle = grupo controle sem diabetes; Controle Diab = grupo controle diabético; Curc 50 = grupo diabético tratado com curcumina 50 mg/Kg; Curc 100 = grupo diabético tratado com curcumina 100 mg/Kg; RI46 50 = grupo diabético tratado com RI46 50 mg/Kg; RI46 100 = grupo diabético tratado com RI46 100 mg/Kg.

**Gráfico 8 – Evolução do peso corporal dos animais ao longo de todo período experimental.**



Aclim. =Período de aclimação, aferição de peso nos dias indicados; Ind. = Período de indução, aferição de peso nos dias indicados; Gav. =Período de gavagem, aferição de peso nos dias indicados. Controle = grupo controle sem diabetes; Controle Diab = grupo controle diabético; Curc 50 = grupo diabético tratado com curcumina 50 mg/Kg; Curc 100 = grupo diabético

tratado com curcumina 100 mg/Kg; RI46 50 = grupo diabético tratado com RI46 50 mg/Kg; RI46 100 = grupo diabético tratado com RI46 100 mg/Kg.

Pela análise do **Gráfico 7**, observa-se que o consumo de ração inicial foi semelhante em todos os grupos, porém no período de indução o grupo controle sem diabetes apresentou um consumo superior aos demais grupos recém-diabéticos. Durante o período de gavagem, a quantidade de ração consumida pelo grupo controle se manteve praticamente constante, enquanto os outros grupos aumentaram o consumo até o 15º dia de gavagem, com tendência a posterior estabilização. Nota-se assim, um aumento significativo na ingestão de alimentos em ratos diabéticos em comparação com o grupo controle sem diabetes, porém os tratamentos com curcumina e RI46 não apresentaram qualquer influência quanto ao consumo de ração quando comparados aos animais diabéticos sem tratamento.

Quanto ao peso dos ratos (**Gráfico 8**), durante o período de aclimação e início do período de indução, os animais de todos os grupos mantiveram semelhante ganho de peso corporal. No final do período de indução, o grupo controle sem diabetes se destacou dos demais com um maior ganho de peso, que perdurou por todo o estudo. Ao final do experimento, observou-se um menor ganho de peso corporal em ratos diabéticos em comparação com o grupo controle sem diabetes. Entre os grupos tratados com curcumina e RI46, os animais tratados com RI46 100 mg/Kg tiveram ganho de peso similar ao grupo controle diabético. Já os animais tratados com curcumina 50 mg/Kg seguido por RI46 50 mg/Kg e curcumina 100 mg/Kg tiveram um maior ganho de peso quando comparados ao grupo controle diabético, mostrando alguma evidência protetora dessas substâncias quanto ao ganho de peso dos animais.

Dessa forma, os tratamentos com curcumina e RI46 não tiveram influência no consumo alimentar dos animais, mas preveniram, pelo menos em partes, a perda de peso corporal quando comparados aos diabéticos não tratados. O mesmo foi observado em relação ao peso de ratos por Palma e colaboradores (2014) e Gutierrez e colaboradores (2012), mostrando o efeito protetor da curcumina na perda de peso corporal. Porém, nesse mesmo estudo observou-se uma influência no consumo alimentar, sendo que no grupo tratado com curcumina houve uma prevenção no aumento da ingestão alimentar em ratos diabéticos, evidência essa

não encontrada neste trabalho. Najafian (2014) também observou que o tratamento com curcumina preveniu o aumento no consumo alimentar de ratos quando comparado ao grupo diabético sem tratamento, mas não preveniu a perda de peso corporal.

Assim como Najafian (2014), e ao contrário de Gutierrez e colaboradores (2012) e do presente trabalho, Zhao e colaboradores (2014) e Soetikno e colaboradores (2012) não observaram efeito da curcumina na evolução do peso corporal de ratos diabéticos. Suryanarayana e colaboradores (2007) não observaram efeito da curcumina em nenhum desses dois parâmetros em ratos diabéticos.

A perda de peso, sintoma característico do DM descontrolado e que pode ser observado a partir do modelo de indução adotado neste trabalho, pode ser explicada pela ausência de insulina do DM, que compromete a captação de glicose pelas células do organismo, tornando esse carboidrato indisponível para a obtenção de energia. Dessa forma, o organismo entra em um estado de catabolismo elevado, ocorrendo a degradação ou perda de proteínas estruturais responsáveis pela rigidez, consistência e elasticidade dos tecidos, e aumento da lipólise, ambos influenciando a redução do peso corporal no DM associada à desidratação por poliúria (SARKAHIL et al., 2007).

Já o aumento da ingestão alimentar que ocorre no DM pode ser atribuído a distúrbios nos processos de regulação da fome no hipotálamo. Após as refeições, a insulina está presente em altas concentrações plasmáticas e é transportada através da barreira hematoencefálica, atuando como anorexígeno com ação predominantemente no núcleo arqueado do hipotálamo, gerando saciedade. Porém no DM, com ausência de insulina, esse sistema central não é inibido e, portanto, sinaliza falta de glicose e fome, estimulando maior ingestão alimentar (BENTO-SANTOS et al., 2012; SANDE-LEE & VELLOSO, 2012)

No presente estudo também foi observado que os animais dos grupos diabéticos apresentaram outros sintomas típicos de DM descompensado além da polifagia e poliastenia, como poliúria e polidipsia, condizentes com sintomas encontrados em outros experimentos que utilizaram o modelo de diabetes induzido por STZ em ratos (GUTIERRES et al., 2012; NAJAFIAN, 2014). Tais sintomas são amplamente conhecidos no DM e relacionados ao estado de hiperglicemia, sendo

esse o principal fator responsável pelo desenvolvimento da poliúria, polifagia e polidipsia.

O fígado dos animais foi retirado e seu peso avaliado, conforme mostrado na **Tabela 2**. Os valores estão apresentados na forma de porcentagem de peso corporal do animal  $\pm$  desvio padrão, seguido por teste de comparação de médias.

**Tabela 2** – Valores médios do peso do fígado dos animais de cada grupo dados em relação ao peso corporal total.

Grupo	Fígado (% de peso corporal) $\pm$ D.P.
Controle	3,65 $\pm$ 0,18 <sup>b</sup>
Controle Diab	4,86 $\pm$ 0,66 <sup>a</sup>
Curc 50	4,89 $\pm$ 0,44 <sup>a</sup>
Curc 100	4,79 $\pm$ 0,35 <sup>a</sup>
RI46 50	4,94 $\pm$ 0,54 <sup>a</sup>
RI46 100	5,43 $\pm$ 0,69 <sup>a</sup>

Médias  $\pm$  desvio padrão seguidas por letras distintas nas colunas diferem entre si pelo teste de Tukey, com 95% de confiança. Controle = grupo controle sem diabetes; Controle Diab = grupo controle diabético; Curc 50 = grupo diabético tratado com curcumina 50 mg/Kg; Curc 100 = grupo diabético tratado com curcumina 100 mg/Kg; RI46 50 = grupo diabético tratado com RI46 50 mg/Kg; RI46 100 = grupo diabético tratado com RI46 100 mg/Kg.

Observa-se que apenas o grupo controle se diferenciou estatisticamente dos demais, possuindo menor média de peso do fígado em relação ao peso corporal. Dessa forma, conclui-se que todos os grupos diabéticos, com e sem tratamento, tiveram aumento da relação do peso do fígado ao peso corporal em comparação ao grupo sem diabetes. Resultado semelhante foi encontrado por Maritim e colaboradores (2003), que observou um aumento no peso do fígado em relação ao peso corporal de ratos, dado em porcentagem, no grupo diabético quando comparado ao grupo normal sem diabetes. Esse fato pode ser explicado pela falta de produção da insulina nesse modelo de DM experimental, causando distúrbios no metabolismo de carboidratos, proteínas e lipídeos. Nessa patogenia, o tecido adiposo começa a liberar gordura estocada para ser usada como energia pelo organismo e passa antes pelo fígado, que começa a acumular esse excesso de lipídeos disponíveis (SOUSA & NAVARRO, 2013).

### 5.2.2 TBARS

Depois de retirado o fígado dos animais e avaliado o peso, este órgão foi congelado em nitrogênio líquido e mantido sob congelamento a  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  até a realização das análises de peroxidação lipídica pelo TBARS e de enzimas antioxidantes.

Na **Tabela 3** estão apresentadas as médias de cada grupo para o TABRS realizado no fígado dos animais em estudo. Os valores estão apresentados com base na curva padrão de MDA  $\pm$  desvio padrão, seguido por teste de comparação de médias.

**Tabela 3** – Valores obtidos no teste de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) nas amostras hepáticas como avaliação da peroxidação lipídica.

Grupo	TBARS ( $\mu\text{M}$ de MDA/g de fígado)
Controle	$32,67 \pm 8,66$ <sup>a</sup>
Controle Diab	$36,35 \pm 8,13$ <sup>a</sup>
Curc 50	$49,68 \pm 13,15$ <sup>a</sup>
Curc 100	$44,04 \pm 8,14$ <sup>a</sup>
RI46 50	$48,94 \pm 18,37$ <sup>a</sup>
RI46 100	$52,38 \pm 23,81$ <sup>a</sup>

Médias  $\pm$ desvio padrão seguidas por letrasdistintas nas colunas diferem entre si pelo teste de Tukey, com95% de confiança. Controle = grupo controle sem diabetes; Controle Diab = grupo controle diabético; Curc 50 = grupo diabético tratado com curcumina 50 mg/Kg; Curc 100 = grupo diabético tratado com curcumina100 mg/Kg; RI46 50 = grupo diabético tratado com RI46 50 mg/Kg; RI46 100 = grupo diabético tratado com RI46 100 mg/Kg.

Com base nos resultados encontrados neste estudo não foram observadas alterações dos níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico entre os grupos controle e grupos tratados. Em outros estudos observou-se um aumento nos níveis de TBARS em ratos diabéticos comparados aos animais sem diabetes, bem como efeito do tratamento com curcumina que preveniu a elevação da peroxidação lipídica quando comparados aos grupos diabéticos sem tratamento (SURYANARAYANA et al., 2007; HUSSEIN & ABU-ZINADAH, 2010; SOETIKNO et al., 2012; PALMA 2014).

Sabe-se que a hiperglicemia no DM é responsável pelo aumento da produção de ERs causando, assim, estresse oxidativo, que por sua vez leva ao comprometimento das defesas antioxidantes e maior susceptibilidade a peroxidação

lipídica. Embora os grupos diabéticos tenham apresentado altas taxas glicêmicas neste ensaio, não foi observado nesses grupos um aumento da peroxidação lipídica avaliado pelo TBARS. Tal fato pode estar relacionado ao estado do sistema antioxidante, que desempenha um papel importante na eliminação das espécies reativas, que pode estar protegendo o organismo da peroxidação lipídica no tempo de estudo realizado de 31 dias.

### 5.2.3 PROTEÍNAS TOTAIS E ATIVIDADE DAS ENZIMAS ANTIOXIDANTES

Na **Tabela 4** estão apresentados os teores de proteínas totais encontrados no fígado dos animais em estudo, e os resultados obtidos nos testes da atividade da SOD, CAT, GPx e GR estão apresentados na **Tabela 5**, seguido de  $\pm$  desvio padrão e teste de comparação de médias.

**Tabela 4** – Valores obtidos no teste de proteínas totais em amostras hepáticas.

Grupo	Proteínas totais do fígado (%)
Controle	5,26 $\pm$ 2,28 <sup>a</sup>
Controle Diab	3,56 $\pm$ 1,15 <sup>ab</sup>
Curc 50	4,01 $\pm$ 0,75 <sup>ab</sup>
Curc 100	2,53 $\pm$ 0,93 <sup>b</sup>
RI46 50	4,34 $\pm$ 0,14 <sup>ab</sup>
RI46 100	2,88 $\pm$ 1,38 <sup>b</sup>

Médias  $\pm$  desvio padrão seguidas por letras distintas nas colunas diferem entre si pelo teste de Tukey, com 95% de confiança. Controle = grupo controle sem diabetes; Controle Diab = grupo controle diabético; Curc 50 = grupo diabético tratado com curcumina 50 mg/Kg; Curc 100 = grupo diabético tratado com curcumina 100 mg/Kg; RI46 50 = grupo diabético tratado com RI46 50 mg/Kg; RI46 100 = grupo diabético tratado com RI46 100 mg/Kg.

**Tabela 5** – Valores obtidos na dosagem das enzimas hepáticas CAT, SOD, GPx e GR.

Ensaio	Controle	Controle Diab	Curc 50	Curc 100	RI46 50	RI46 100
SOD (U SOD/mg proteína)	25,35 $\pm$ 6,70 <sup>b</sup>	34,46 $\pm$ 6,87 <sup>ab</sup>	35,48 $\pm$ 6,16 <sup>ab</sup>	51,28 $\pm$ 25,66 <sup>ab</sup>	29,29 $\pm$ 1,75 <sup>ab</sup>	54,17 $\pm$ 24,38 <sup>a</sup>
CAT ( $\Delta$ E.min <sup>-1</sup> .mg <sup>-1</sup> proteína)	0,32 $\pm$ 0,12 <sup>b</sup>	0,46 $\pm$ 0,09 <sup>ab</sup>	0,46 $\pm$ 0,11 <sup>ab</sup>	0,66 $\pm$ 0,35 <sup>ab</sup>	0,39 $\pm$ 0,02 <sup>ab</sup>	0,74 $\pm$ 0,38 <sup>a</sup>
GPx ( $\Delta$ E.min <sup>-1</sup> .mg <sup>-1</sup> proteína)	0,66 $\pm$ 0,22 <sup>ab</sup>	0,63 $\pm$ 0,27 <sup>ab</sup>	0,44 $\pm$ 0,20 <sup>b</sup>	0,61 $\pm$ 0,17 <sup>ab</sup>	1,06 $\pm$ 0,18 <sup>a</sup>	0,82 $\pm$ 0,50 <sup>ab</sup>
GR ( $\Delta$ E.min <sup>-1</sup> .mg <sup>-1</sup> proteína)	2,05 $\pm$ 0,63 <sup>b</sup>	2,55 $\pm$ 0,41 <sup>ab</sup>	3,05 $\pm$ 0,44 <sup>ab</sup>	4,56 $\pm$ 2,10 <sup>ab</sup>	2,84 $\pm$ 0,22 <sup>ab</sup>	5,05 $\pm$ 2,70 <sup>a</sup>

Médias  $\pm$ desvio padrão seguidas por letras distintas nas colunas diferem entre si pelo teste de Tukey, com 95% de confiança. Controle = grupo controle sem diabetes; Controle Diab = grupo controle diabético; Curc 50 = grupo diabético tratado com curcumina 50 mg/Kg; Curc 100 = grupo diabético tratado com curcumina 100 mg/Kg; RI46 50 = grupo diabético tratado com RI46 50 mg/Kg; RI46 100 = grupo diabético tratado com RI46 100 mg/Kg.

Neste estudo, não houve diferença no teor de proteínas totais hepáticas entre os grupos controle com e sem diabetes. Os tratamentos com curcumina e RI46 na concentração de 100 mg/Kg apresentaram proteínas totais estatisticamente menores que o grupo controle sem diabetes, porém, sem diferir estatisticamente dos grupos diabéticos tratados ou não. Tal avaliação é realizada como base para o cálculo das enzimas hepáticas.

A avaliação da superóxido dismutase, catalase, glutathione peroxidase e glutathione reductase no tecido hepático revelou que a atividade dessas enzimas não foi estatisticamente diferente entre os grupos controle com e sem diabetes. Entre os grupos diabéticos tratados com curcumina e RI46, a administração de RI46 na dose de 100 mg/Kg proporcionou níveis elevados das enzimas SOD, CAT e GR, que não diferiram estatisticamente dos outros grupos diabéticos, mas diferiram do controle sem diabetes. Já em relação aos níveis de GPx, não houve diferença entre os grupos controle com e sem diabetes e os grupos tratados com curcumina e RI46. Apenas os grupos Curc 50 e RI46 50 foram estatisticamente diferentes entre si, este apresentando valor mais alto ( $1,06 \pm 0,18 \Delta E \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$  proteína) que aquele ( $0,44 \pm 0,20 \Delta E \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$  proteína). Dessa forma, os níveis enzimáticos no fígado não se apresentaram diminuídos no diabetes, e o tratamento com curcumina não exerceu efeitos comprovados estatisticamente nas taxas de atividade enzimática estudadas.

Corroborando com os resultados aqui encontrados, Suryanarayana e colaboradores (2007) também não observaram diferença estatística entre o grupo controle de ratos sem diabetes e o grupo controle diabético quanto aos níveis de SOD, porém foi observado que o tratamento com curcumina diminuiu os níveis de SOD abaixo dos valores encontrados no controle sem diabetes e no controle diabético. Neste mesmo trabalho, não foi encontrada diferença estatística quanto aos níveis de CAT entre todos os grupos, com e sem diabetes, tratados ou não. Ainda nesse estudo, Suryanarayana e colaboradores encontraram valores de GPx maiores nos grupos diabéticos que no controle, não havendo diferença estatística



entre os grupos diabéticos tratados e não tratados, mostrando que a curcumina não exerceu efeito nessa enzima.

Em outro estudo, realizado por Soetikno e colaboradores (2012), observou-se que o tratamento com curcumina em ratos aumentou significativamente os níveis de GPx quando comparados ao controle diabético, e Hussein e Abu-Zinadah (2010) encontraram valores de SOD e CAT aumentados a bem próximos do normal pelo tratamento de ratos diabéticos com curcumina. Palma e colaboradores (2014) observaram o contrário em relação à enzima CAT em ratos diabéticos tratados com curcumina, sendo esta capaz de diminuir os níveis de CAT em relação aos diabéticos sem tratamento. Em seu estudo, Palma e colaboradores observaram que os valores de CAT foram maiores no grupo diabético que no controle sem diabetes, e o tratamento com insulina abaixou os níveis dessa enzima próximos aos normais. Em relação à SOD, Palma e colaboradores encontraram valores diminuídos dessa enzima no grupo diabético quando comparado ao grupo controle sem diabetes, e o tratamento com curcumina foi capaz de aumentar levemente esses níveis, mostrando grande variação nos resultados relativos a esses testes em diferentes trabalhos.

O efeito do diabetes na atividade enzimática pode variar de acordo com o sexo, a espécie de animal, o tempo em que os animais permanecem diabéticos ou o tecido estudado, podendo essa atividade ser elevada, diminuída ou inalterada (MARITIM et al., 2003). Embora seja esperado que um agente antioxidante exógeno combata o excesso de espécies reativas em um estado de estresse oxidativo, poupando, assim, o sistema de defesa antioxidante e evitando sua diminuição, a ligação entre enzimas antioxidantes alteradas e aumento do estresse oxidativo não é simples ou direta, com aumento ou diminuição nas atividades, pois os sistemas antioxidantes são complexos e nem sempre são unidirecionais (SURYANARAYANA et al., 2007).

Nota-se que os diversos estudos citados utilizando modelo experimental de DM induzido por STZ e tratamento com curcumina apresentam resultados controversos acerca da atividade antioxidante de enzimas hepáticas.

De forma geral, relacionando os tratamentos com curcumina e com RI46 deste trabalho, não foram observados diferentes efeitos quando analisadas as

atividades de enzimas hepáticas após 31 dias de administração das substâncias, apesar de haver uma nítida tendência ao aumento na concentração dessas enzimas.

#### 5.2.4 PARÂMETROS BIOQUÍMICOS

Um total de 14 ensaios bioquímicos foi realizado nas amostras de soro ou plasma dos animais em estudo, encontrando-se diferença estatística nos valores de ácido úrico entre os grupos controle e RI46 100, FA entre os grupos controle, controle diabético e Curc 100, ALT e ureia entre o controle e controle diabético. As médias dos valores encontrados estão apresentadas na **Tabela 6** seguidos de  $\pm$  desvio padrão e teste de comparação de médias.

**Tabela 6** – Valores obtidos nos ensaios bioquímicos realizados nas amostras de sangue dos animais.

Ensaio	Controle	Controle Diab	Curc 50	Curc 100	RI46 50	RI46 100
Ácido úrico (mg/dL)	0,75 $\pm$ 0,15 <sup>b</sup>	1,75 $\pm$ 0,97 <sup>ab</sup>	1,17 $\pm$ 0,36 <sup>ab</sup>	1,02 $\pm$ 0,14 <sup>ab</sup>	0,84 $\pm$ 0,18 <sup>ab</sup>	1,84 $\pm$ 1,08 <sup>a</sup>
Fosfatase alcalina (U/L)	87,52 $\pm$ 5,83 <sup>c</sup>	280,50 $\pm$ 44,90 <sup>b</sup>	236,14 $\pm$ 104,08 <sup>b</sup>	402,82 $\pm$ 31,25 <sup>a</sup>	304,24 $\pm$ 29,83 <sup>b</sup>	304,87 $\pm$ 62,18 <sup>b</sup>
ALT (U/mL)	71,97 $\pm$ 27,21 <sup>b</sup>	147,88 $\pm$ 43,62 <sup>a</sup>	111,36 $\pm$ 15,47 <sup>ab</sup>	99,32 $\pm$ 14,10 <sup>ab</sup>	99,30 $\pm$ 42,12 <sup>ab</sup>	131,18 $\pm$ 29,20 <sup>a</sup>
Ureia (mg/dL)	35,23 $\pm$ 3,90 <sup>b</sup>	71,30 $\pm$ 27,23 <sup>a</sup>	65,58 $\pm$ 21,86 <sup>ab</sup>	71,70 $\pm$ 20,42 <sup>a</sup>	54,18 $\pm$ 5,46 <sup>ab</sup>	74,18 $\pm$ 13,56 <sup>a</sup>
Albumina (g/dL)	2,34 $\pm$ 0,09 <sup>a</sup>	2,04 $\pm$ 0,20 <sup>a</sup>	2,30 $\pm$ 0,20 <sup>a</sup>	2,31 $\pm$ 0,20 <sup>a</sup>	2,35 $\pm$ 0,24 <sup>a</sup>	2,28 $\pm$ 0,19 <sup>a</sup>
Amilase (U/dL)	708,88 $\pm$ 23,79 <sup>a</sup>	711,75 $\pm$ 20,15 <sup>a</sup>	704,75 $\pm$ 3,17 <sup>a</sup>	694,37 $\pm$ 23,00 <sup>a</sup>	698,35 $\pm$ 21,69 <sup>a</sup>	701,31 $\pm$ 4,63 <sup>a</sup>
Colesterol total (mg/dL)	105,34 $\pm$ 21,32 <sup>a</sup>	93,47 $\pm$ 16,15 <sup>a</sup>	106,73 $\pm$ 13,27 <sup>a</sup>	92,07 $\pm$ 12,17 <sup>a</sup>	86,17 $\pm$ 9,48 <sup>a</sup>	107,76 $\pm$ 21,42 <sup>a</sup>
Colesterol HDL (mg/dL)	88,95 $\pm$ 20,33 <sup>a</sup>	71,48 $\pm$ 12,51 <sup>a</sup>	88,46 $\pm$ 12,68 <sup>a</sup>	73,83 $\pm$ 5,06 <sup>a</sup>	73,73 $\pm$ 6,13 <sup>a</sup>	80,60 $\pm$ 9,67 <sup>a</sup>
Creatinina (mg/dL)	0,37 $\pm$ 0,04 <sup>a</sup>	0,35 $\pm$ 0,13 <sup>a</sup>	0,41 $\pm$ 0,03 <sup>a</sup>	0,41 $\pm$ 0,06 <sup>a</sup>	0,39 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>	0,42 $\pm$ 0,06 <sup>a</sup>
Hemoglobina (g/dL)	16,38 $\pm$ 1,81 <sup>a</sup>	14,25 $\pm$ 1,73 <sup>a</sup>	16,34 $\pm$ 1,55 <sup>a</sup>	16,07 $\pm$ 0,76 <sup>a</sup>	15,48 $\pm$ 1,12 <sup>a</sup>	15,35 $\pm$ 1,44 <sup>a</sup>
Mg (mg/dL)	2,45 $\pm$ 0,25 <sup>a</sup>	2,92 $\pm$ 0,98 <sup>a</sup>	2,13 $\pm$ 0,13 <sup>a</sup>	2,17 $\pm$ 0,19 <sup>a</sup>	2,13 $\pm$ 0,12 <sup>a</sup>	2,71 $\pm$ 0,75 <sup>a</sup>
Proteínas totais (g/dL)	5,85 $\pm$ 0,34 <sup>a</sup>	5,68 $\pm$ 0,25 <sup>a</sup>	5,55 $\pm$ 0,40 <sup>a</sup>	5,51 $\pm$ 0,28 <sup>a</sup>	5,54 $\pm$ 0,13 <sup>a</sup>	5,57 $\pm$ 0,23 <sup>a</sup>
AST (U/mL)	149,54 $\pm$ 47,12 <sup>a</sup>	179,87 $\pm$ 10,38 <sup>a</sup>	171,25 $\pm$ 19,41 <sup>a</sup>	156,86 $\pm$ 15,80 <sup>a</sup>	133,13 $\pm$ 44,24 <sup>a</sup>	160,65 $\pm$ 27,10 <sup>a</sup>
Triglicérides (mg/dL)	107,78 $\pm$ 60,20 <sup>a</sup>	63,54 $\pm$ 27,05 <sup>a</sup>	94,58 $\pm$ 43,23 <sup>a</sup>	112,94 $\pm$ 47,03 <sup>a</sup>	72,59 $\pm$ 19,33 <sup>a</sup>	98,45 $\pm$ 48,48 <sup>a</sup>

Médias  $\pm$  desvio padrão seguidas por letras distintas nas colunas diferem entre si pelo teste de Tukey, com 95% de confiança. Controle = grupo controle sem diabetes; Controle Diab = grupo controle diabético; Curc 50 = grupo diabético tratado com curcumina 50 mg/Kg; Curc 100 = grupo diabético tratado com curcumina 100 mg/Kg; RI46 50 = grupo diabético tratado com RI46 50 mg/Kg; RI46 100 = grupo diabético tratado com RI46 100 mg/Kg.

O teor de ácido úrico no sangue dos animais em estudo foi menor no grupo controle, mas este diferiu estatisticamente apenas do grupo RI46 100. Os grupos controle diabético, tratados com curcumina 50, curcumina 100 e RI46 50 não diferiram estatisticamente do grupo controle e do grupo RI46 100. O ácido úrico, produto final do metabolismo das purinas, é formado no fígado e excretado principalmente pelos rins, e sua elevação sanguínea pode ser um indicador de doença renal, DM, doença cardiovascular e inflamação. Porém, observa-se que o nível deste marcador não se encontrou estatisticamente aumentado no grupo controle diabético em relação ao controle sem diabetes.

Os parâmetros AST, ALT e FA são considerados marcadores de função hepática e a elevação sérica dessas enzimas tem sido relatada em animais diabéticos, sendo reduzidas após o tratamento com insulina (PALMA et al., 2014). AST está presente em grande parte no coração, fígado, músculos esqueléticos, e rins; ALT se encontra em certo número de tecidos diferentes, mas o local principal é o fígado; e as isoformas da FA encontradas no sangue originam-se em sua maior parte do fígado ou do músculo esquelético. Portanto, lesões ou distúrbios que ocasionem um dano celular no fígado podem resultar na liberação dessas enzimas para a corrente sanguínea, servindo como marcador de injúria hepatocelular (GUTIERRES et al., 2012; PRABHAKAR et al., 2013). Neste trabalho, não foi encontrada diferença significativa entre os grupos quanto aos níveis de AST. Já as taxas de ALT e FA foram maiores no controle diabético quando comparadas ao controle sem diabetes, corroborando com vários estudos que indicam associação do DM com a elevação da atividade de enzimas hepáticas (HUSSEIN & ABU-ZINADAH, 2010; GUTIERRES et al., 2012; PALMA et al., 2014). Os grupos diabéticos tratados com curcumina ou RI46 não apresentaram efeito protetor no fígado quanto à enzima FA. Porém, em relação à ALT, os tratamentos com curcumina 50, curcumina 100 e RI46 50 apresentaram níveis estatisticamente semelhantes ao controle sem diabetes, podendo evidenciar uma ação protetora parcial dessas substâncias no fígado com base na avaliação de tal enzima.

Palma e colaboradores (2014) observaram resultados semelhantes quanto aos níveis de ALT no sangue de ratos, que foram mais altos nos diabéticos que nos normais, e o tratamento com curcumina diminuiu essa taxa quando comparado aos

animais diabéticos sem tratamento. Em relação à AST, sem alteração no presente trabalho, obteve taxas mais altas nos diabéticos que no controle, mas a curcumina aumentou levemente esse parâmetro em relação aos diabéticos sem tratamento. Hussein e Abu-Zinadah (2010) observaram que o tratamento com curcumina reduziu a elevação de ALT e AST quando comparado ao grupo de ratos diabético sem tratamento. No estudo feito por Gutierrez e colaboradores (2012), o tratamento de ratos com curcumina evitou o aumento da FA quando comparado ao grupo diabético sem tratamento, mas não diminuiu tanto quanto o tratamento com insulina.

Os parâmetros ureia e creatinina foram utilizados para avaliação da função renal dos animais em estudo. A ureia é um produto residual da digestão de proteínas formada no fígado, já a creatinina é um resíduo do metabolismo de fosfato de creatina pelos tecidos do músculo esquelético, ambas filtradas nos rins (PRABHAKAR et al., 2013). As taxas de ureia avaliadas foram maiores nos grupos de animais diabéticos quando comparados com o grupo controle sem diabetes, porém observa-se que os grupos Curc 50 e RI46 50 não diferiram estatisticamente do grupo controle sem diabetes, sugerindo uma proteção à função renal nesses dois grupos. Quanto ao nível de creatinina, não foi observada diferença significativa entre os grupos, estando de acordo com o encontrado por Palma e colaboradores (2014). Já Soetikno e colaboradores (2013) concluíram que a curcumina em ratos diabéticos evitou, em parte, o aumento desses dois parâmetros sanguíneos, porém não se obtendo valores comparáveis aos dos animais sem diabetes.

Visto que em condições diabéticas a síntese proteica encontra-se diminuída em todos os tecidos e a atividade proteolítica muscular aumentada, ocorre um maior afluxo de aminoácidos para o fígado, elevando os níveis séricos de compostos nitrogenados como ureia e creatina e aumentando o trabalho renal de excreção (PRABHAKAR et al., 2013). Neste estudo, as diferenças estatísticas foram evidentes nos níveis de ureia, mas não de creatinina, fato que pode estar relacionado ao período experimental uma vez que a ureia é mais sensível nas alterações primárias das condições renais (PRATES et al., 2006).

Embora o DM esteja associado frequentemente a dislipidemias, com níveis elevados de colesterol total, LDL e triacilgliceróis, e níveis reduzidos de HDL, não foram encontradas diferenças estatísticas entre os grupos quanto aos níveis séricos

de colesterol total, colesterol HDL e triglicéridos, e a razão para isso não pôde ser elucidada. Gutierrez e colaboradores (2012) também não observaram diferença nos níveis de colesterol HDL em animais diabéticos e normais, mas percebeu que o tratamento com curcumina em ratos diabéticos diminuiu significativamente as taxas de triacilgliceróis em relação ao grupo diabético não tratado, e não influenciou nas taxas de colesterol total.

Nesse estudo, também não foram encontradas diferenças significativas nos valores de albumina e proteínas totais (o que pode ser utilizado como indicativo de alteração no metabolismo de proteínas ou disfunção renal) (SANTOS et al. 2004), amilase (utilizado geralmente como indicativo de enfermidade pancreática ou disfunção renal) (MOTTA, 2000), hemoglobina (indicativo de anemia, doença comum em pacientes com DM) (HUSSEIN & ABU-ZINADAH, 2010) e magnésio (baixas taxas associadas ao DM) (LIMA et al., 2005).

Após a realização dos ensaios bioquímicos no sangue de ratos sem e com diabetes e diabéticos tratados com curcumina e RI46 por um período de 31 dias, observou-se, então, neste estudo, alteração causada por DM nos marcadores de injúria hepatocelular (ALT e FA) e de função renal (ureia, mais sensível nas alterações primárias dos rins, e ácido úrico). Os tratamentos com curcumina 50 e RI46 50 apresentaram valores estatisticamente semelhantes aos animais sem diabetes para os parâmetros ALT e ureia, e sugerem uma ação protetora parcial dessas substâncias no fígado e nos rins de animais com diabetes.

## CONCLUSÃO

A avaliação da atividade antioxidante *in vitro* das substâncias sintéticas revelou que várias delas apresentaram atividade superior à do protótipo curcumina. Em especial, as substâncias sintéticas não diretamente relacionadas à estrutura da curcumina tiveram resultado bom a moderado em pelo menos dois testes, identificando e demonstrando, portanto, o potencial antioxidante de uma promissora nova classe de substâncias, cuja atividade antioxidante ainda não se encontra descrita na literatura.

Embora alguns estudos relatem efeito da curcumina na atividade de enzimas hepáticas antioxidantes, os resultados do presente estudo se assemelham mais a outros trabalhos encontrados na literatura, que não observaram atividade protetora da curcumina quando estudada a atividade dessas enzimas. De forma geral, neste trabalho foi observado que os tratamentos realizados com curcumina e RI46 não apresentaram efeitos nas enzimas hepáticas analisadas, embora houvesse uma nítida tendência ao aumento da atividade dessas enzimas nos grupos tratados. Da mesma forma, não foram detectadas alterações na peroxidação lipídica quando avaliada após tratamento dos animais com as substâncias em estudo. Deve-se, porém, ressaltar que também não foram detectadas alterações estatisticamente relevantes em ambos os parâmetros quando comparados os grupos controle com e sem diabetes, mostrando que talvez esses sistemas não estivessem alterados neste modelo de estudo.

A avaliação de parâmetros bioquímicos sanguíneos, por outro lado, permitiu observar que os tratamentos com curcumina e RI46, ambos com dose de 50 mg/Kg, sugerem uma ação protetora parcial dessas substâncias no fígado e nos rins dos animais com diabetes experimental, demonstrando também o potencial antioxidante *in vivo* dessa nova classe de substâncias, da qual a molécula RI46 faz parte. Isso evidencia sua ação promissora frente às complicações relacionadas ao diabetes, abrindo portas para que novos estudos sejam feitos.

A aparente divergência entre a considerável atividade antioxidante detectada *in vitro* para as moléculas em estudo, e a ausência de alteração nas enzimas hepáticas e teste de peroxidação lipídica, usados como indicativo da atividade

antioxidante *in vivo*, pode ser devido ao fato de cada organismo responder de um jeito único aos estímulos aos quais é submetido, podendo ocorrer uma grande variação na resposta individual. Enquanto é possível exercer um controle sobre a grande maioria das variáveis que envolvem um teste *in vitro*, o mesmo não ocorre com o ensaio animal, onde cada indivíduo representa uma complexa rede de variáveis dependente das particularidades de cada indivíduo.

Além disso, o papel protetor *in vivo* dessas substâncias, demonstrado pelos parâmetros bioquímicos sanguíneos, indica que a sua atividade antioxidante pode estar relacionada a outras vias que não as enzimas hepáticas, evidenciando a necessidade de outros estudos.

## REFERÊNCIAS

AEBI, H. Catalase *in vitro*. **Methods in Enzymology**, v. 105, p. 121-126, 1984.

AGGARWAL, B. B.; HARIKUMAR, K. B. Potential therapeutic effects of curcumin, the anti-inflammatory agent, against neurodegenerative, cardiovascular, pulmonary, metabolic, autoimmune and neoplastic diseases. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 41, n. 1, p. 40-59, 2009.

AGGARWAL, B. B. et al. Curcumin-free turmeric exhibits anti-inflammatory and anticancer activities: Identification of novel components of turmeric. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 57, p. 1529-1542, 2013.

AHSAN, H. et al. Pro-oxidant, anti-oxidant and cleavage activities on DNA of curcumin and its derivatives demethoxycurcumin and bisdemethoxycurcumin. **Chemico-Biological Interactions**, v. 121, p. 161-175, 1999.

AK, T.; GÜLÇİN, I. Antioxidant and radical scavenging properties of curcumin. **Chemico-Biological Interactions**, v. 174, p. 27-37, 2008.

ALAM, M. N.; BRISTI, N. J.; RAFIQUZZAMAN, Md. Review on *in vivo* and *in vitro* methods evaluation of antioxidant activity. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 21, p. 143-152, 2013.

ALEZANDRO, M.R., GRANATO, D., GENOVESE, M.I. Jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba* (Vell.) Berg), a Brazilian grape-like fruit, improves plasma lipid profile in streptozotocin-mediated oxidative stress in diabetic rats. **Food Research International**, v. 54, n. 1, p. 650-659, 2013.

ANAND, P. et al. Bioavailability of curcumin: problems and promises. **Molecular Pharmaceutics**, v. 4, n. 6, p. 807-818, 2007.

ANAND, P. et al. Biological activities of curcumin and its analogues (Congeners) made by man and Mother Nature. **Biochemical Pharmacology**, v. 76, p. 1590-1611, 2008.

ARNAO, M. B.; ACOSTA, M.; CANO, A. Methods to measure the antioxidant activity in plant material: A comparative discussion. **Free Radical Research**, v. 31, p. 89-96, 1999.

ARORA, S.; OJHA, S. K.; VOHORA, D. Characterisation of streptozotocin induced diabetes mellitus in Swiss albino mice. **Global Journal of Pharmacology**, v. 3, n. 2, p. 81-84, 2009.

BAILEY, C. J.; DAY, C. Metformin: its botanical background. **Practical Diabetes International**, v. 21, n. 3, p. 115-117, 2004.



BARBOSA, K. B. F. et al. Estresse oxidativo: avaliação de marcadores. **Nutrire: Revista da Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição**, v. 33, n. 2, p. 111-128, 2008.

BARBOSA, K. B. F. et al. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutrição**, v. 23, n. 4, p. 629-643, 2010.

BENTO-SANTOS, A. et al. Desnutrição perinatal e o controle hipotalâmico do comportamento alimentar e do metabolismo do músculo esquelético. **Revista de Nutrição**, v. 25, n. 3, p. 403-413, 2012.

BENZIE, I.F.F.; STRAIN, J.J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. **Analytical Biochemistry**, v. 239, p. 70-76, 1996.

BHULLAR, K. S. et al. Curcumin and its carbocyclic analogs: structure-activity in relation to antioxidant and selected biological properties. **Molecules**, v. 18, p. 5389-5404, 2013.

BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BUEGE, J. A., AUST, S. D. Microsomal lipid peroxidation. **Methods in Enzymology**, v. 52, p. 302-310, 1978.

CARLBERG, I.; MANNERVIK, B. Purification and characterization of the flavoenzyme glutathione reductase from rat liver. **Journal of Biological Chemistry**, v. 250, p. 5475-5480, 1975.

CAROCHO, M.; FERREIRA, I. C. F. R. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. **Food and Chemical Toxicology**, v. 51, p. 15-25, 2013.

CHAMPE, P. C. et al. **Bioquímica ilustrada**. 3 ed. Porto Alegre: Ed. Artmed, p. 335-346, 2006.

CHANDRU, H. et al. *In vivo* growth inhibitory and anti-angiogenic effects of synthetic novel dienonecyclopropoxycurcumin analogs on mouse Ehrlich ascites tumor. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 15, p. 7696-7703, 2007.

CHOI, H. Antioxidant activity of *Curcuma Longa* L., novel foodstuff. **Molecular & Cellular Toxicology**, v. 5, n. 3, p. 237-242, 2009.

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

DAI, F. et al. Antioxidative effects of curcumin and its analogues against the free-radical-induced peroxidation of linoleic acid in micelles. **Phytotherapy Research**, v. 23, p. 1220-1228, 2009.

DAWIDOWICZ, A. L.; WIANOWSKA, D.; OLSZOWY, M. On practical problems in estimation of antioxidant activity of compounds by DPPH• method (Problems in estimation of antioxidant activity). **Food Chemistry**, v. 131, p. 1037-1043, 2012.

DELFINO, V. D. A. et al. *Diabetes mellitus* induzido por estreptozotocina: comparação em longo prazo entre duas vias de administração. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, v. 24, n. 1, p. 31-36, 2002.

DEVICICH, D. A.; PEDERSEN, I. K.; PETRIE, K. J. You eat what you are: Modern health worries and the acceptance of natural and synthetic additives in functional foods. **Appetite**, v. 48, p. 333-337, 2007.

DINKOVA-KOSTOVA, A. T. et al. Phenolic Michael reaction acceptors: combined direct and indirect antioxidant defenses against electrophiles and oxidants. **Medicinal Chemistry**, v. 3, n. 3, p. 261-268, 2007.

DU, Z. et al. Anti-proliferative, anti-inflammatory and antioxidant effects of curcumin analogue A<sub>2</sub>. **Archives of Pharmacal Research**, v. 36, n. 10, p. 1204-1210, 2013.

ERYANTI, Y. et al. Synthesizing derivatives from cyclopentanone analogue curcumin and their toxic, antioxidant and anti-inflammatory activities. **Makara Journal of Science**, v. 15, n. 2, p. 117-123, 2011.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 43, n. 1, p. 61-68, 1997.

FILHO, A. B. C. et al. Cúrcuma: planta medicinal, condimentar e de outros usos potenciais. **Ciência Rural**, v. 30, n. 1, p. 171-175, 2000.

FILHO, A. B. C. et al. Época e densidade de plantio na produção de cúrcuma. **Ciência Rural**, v. 34, n. 4, p. 1021-1026, 2004.

FLOHÉ, L. & GÜNZLER, W. A. Assays of glutathione peroxidase. **Methods in Enzymology**, v. 205, p. 114-121, 1984.

GOYAL, M. M.; BASAK, A. Human catalase: looking for complete identity. **Protein & Cell**, v. 1, n. 10, p. 888-897, 2010.

GROTTO, D. et al. Importance of the lipid peroxidation biomarkers and methodological aspects for malondialdehyde quantification. **Química Nova**, v. 32, n. 1, p. 169-174, 2009.

GÜLÇİN, I. Antioxidant activity of food constituents: an overview. **Archives of Toxicology**, v. 86, p. 345-391, 2012.

GUTIERRES, V. O. **Avaliação dos efeitos fisiológicos e bioquímicos do tratamento com curcumina incorporada ao iogurte no diabetes experimental**. 2011. 106 f. Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia aplicada à Farmácia) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Julio Mesquita Filho, Araraquara, 2011.

GUTIERRES, V. O. et al. Curcumin-supplemented yoghurt improves physiological and biochemical markers of experimental diabetes. **British Journal of Nutrition**, v. 108, p. 440-448, 2012.

HALLIWELL, B.; CHIRICO, S. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement and significance. **The American Journal Clinical**, v. 57, p. 715S-725S, 1993.

HATCHER, H. et al. Curcumin: From ancient medicine to current clinical trials. **Cellular and Molecular Life Sciences**, n. 65, p. 1631-1652, 2008.

HENRIQUES, G. S. et al. Aplicação do método de índice glicêmico em modelo de ratos: padronização utilizando fórmula enteral de composição definida para animais normais e feitos diabéticos por aplicação de estreptozotocina. **Revista do Médico Residente**, v. 12, n. 2, p. 67-78, 2010.

HONORATO, T. C. et al. Aditivos alimentares: aplicações e toxicologia. **Revista Verde**, v. 8, n. 5, p. 01-11, 2013.

HUANG, D.; OU, B.; PRIOR, R. L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 1841-1856, 2005.

HUSSEIN, H. K.; ABU-ZINADAH, O. A. Antioxidant effect of curcumin extracts in induced diabetic Wister rats. **International Journal of Zoological Research**, 2010.

JEENGER, M. K. et al. Curcumin: A pleiotropic phytonutrient in diabetic complications. **Nutrition**, p. 1-8, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.nut.2014.06.015>>. Acesso em: 18 set. 2014.

KOHEN, R.; NYSKA, A. Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. **Toxicologic Pathology**, v. 30, n. 6, p. 620-250, 2002.

KUMAR, T. P. et al. Role of curcumin in the prevention of cholinergic mediated cortical dysfunctions in streptozotocin-induced diabetic rats. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 331, p. 1-10, 2011.

LEE, K. et al. Synthesis and biological evaluation of curcumin-like diarylpentanoid analogues for anti-inflammatory, antioxidant and anti-tyrosinase activities. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 44, p. 3195-3200, 2009.

LI, Y. et al. Curcumin analog 1,5-bis(2-trifluoromethylphenyl)-1,4-pentadien-3-one exhibits enhanced ability on Nrf2 activation and protection against acrolein-induced ARPE-19 cell toxicity. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 272, n. 3, p. 726-735, 2013.

LIMA, A. **Caracterização química, avaliação da atividade antioxidante *in vitro* e *in vivo* e identificação dos compostos fenólicos presentes no Pequi (*Caryocar brasiliense*, Camb.).** 2008. 178 f. Tese (Doutorado em Ciências de Alimentos) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

LIMA, M. L. Deficiência de magnésio e resistência à insulina em pacientes com diabetes mellitus tipo 2. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 49, n. 6, p. 959-963, 2005.

LÓPEZ-ALARCÓN, C.; DENICOLA, A. Evaluating the antioxidant capacity of natural products: A review on chemical and cellular-based assays. **Analytica Chimica Acta**, v. 736, p. 1-10, 2013.

LUE, B. et al. Antioxidant properties of modified rutin esters by DPPH, reducing power, iron chelation and human low density lipoprotein assays. **Food Chemistry**, v. 123, p. 221-230, 2010.

MAGALHÃES, L. M. et al. Methodological aspects about *in vitro* evaluation of antioxidant properties. **Analytica Chimica Acta**, v. 613, p. 1-19, 2008.

MARITIM, A. C.; SANDERS, R. A.; WATKINS, J. B. Effects of  $\alpha$ -lipoic acid on biomarkers of oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 14, p. 288-294, 2003.

MARKLUND, S.; MARKLUND, G. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. **European Journal of Biochemistry**, v. 47, p. 469-474, 1974.

MARTINELLO, F. et al. Hypolipemic and antioxidant activities from *Tamarindus indica* L. pulp fruit extract in hypercholesterolemic hamsters. **Food and Chemical Toxicology**, v. 44, n. 6, p. 810-818, 2006.

MARTÍNEZ-VALVERDE, I.; PERIAGO, M. J.; ROS, G. Significado nutricional de los compuestos fenólicos de la dieta. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, v. 51, n. 1, p. 5-18, 2000.

MENG, B.; LI, J.; CAO, H. Antioxidant and Antiinflammatory Activities of Curcumin on Diabetes Mellitus and its Complications. **Current Pharmaceutical Design**, v. 19, p. 2101-2113, 2013.

MILLER, A. Superoxide dismutases: Ancient enzymes and new insights. **FEBS Letters**, n. 586, p. 585-595, 2012.

MOHAMMADI, K. et al. Synthesis and characterization of dual function vanadyl, gallium and indium curcumin complexes for medicinal applications. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 99, p. 2217-2225, 2005.

MOTTA, V. T. **Bioquímica clínica: princípios e interpretações**. 9 ed. Porto Alegre: Ed. Médica Missau, p. 89-117, 2003.

MURATA, M. et al. Site-specific DNA methylation and apoptosis: induction by diabetogenic streptozotocin. **Biochemical Pharmacology**, v. 57, p. 881-887, 1999.

NAJAFIAN, M. Effect of Curcumin on Metabolism of Lipids in Streptozotocin-induced Diabetic and normal Rats. **Advances in Environmental Biology**, v. 8, n. 12, p. 170-177, 2014.

NENADIS, N.; LAZARIDOU, O.; TSIMIDOU, M. Z. Use of reference compounds in antioxidant activity assessment. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 5452-5460, 2007.

NIKI, E. Assessment of Antioxidant Capacity *in vitro* and *in vivo*. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 49, p. 503-515, 2010.

OLIVEIRA, A. C.; VALENTIM, I. B.; GOULART, M. O. F. Fontes vegetais naturais de antioxidantes. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 689-702, 2009.

PAE, H. et al. Dimethoxycurcumin, a synthetic curcumin analogue with higher metabolic stability, inhibits NO production, inducible NO synthase expression and NF- $\kappa$ B activation in RAW264.7 macrophages activated with LPS. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 52, p. 1082-1091, 2008.

PAHO, Pan American Health Organization. Disponível em: <[http://www.paho.org/bra/index.php?option=com\\_content&view=article&id=394:diabetes-mellitus&Itemid=539](http://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=394:diabetes-mellitus&Itemid=539)>. Acesso em: 18 nov. 2014.

PALMA, H. E. et al. Oxidative stress parameters in blood, liver, and kidney of diabetic rats treated with curcumin and/or insulin. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 368, p. 199-210, 2014.

PAPASTERGIADIS, A. et al. Malondialdehyde Measurement in Oxidized Foods: Evaluation of the Spectrophotometric Thiobarbituric Acid Reactive Substances (TBARS) Test in Various Foods. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, p. 9589-9594, 2012.

PEEYUSH, K. T. et al. Neuroprotective role of curcumin in the cerebellum of streptozotocin-induced diabetic rats. **Life Sciences**, v. 85, p. 704-710, 2009.

PEREIRA, R. C. A; MOREIRA, M. R. Comunicado técnico 142: Cultivo de *Curcuma longa* L. (Açafrão-da-índia ou Cúrcuma). Embrapa, Fortaleza, Ceará, 2009.

Disponível em: <<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/CNPAT-2010/11840/1/cot-142.pdf>>. Acesso em: 05 dez. 2014.

PERRY, J. J. P. et al. The structural biochemistry of the superoxide dismutases. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1084, p. 245-262, 2010.

PIRES, L. F.; FREITAS, R. M.; RODRIGUES, A. C. T. Efeito antidepressivo e atividade serotoninérgica da curcumina em modelos de animais de depressão. **Revista de Farmacologia de Chile**, v. 6, n. 1, p. 37-44, 2013.

PRABHAKAR, P. K. et al. Synergistic interaction of ferulic acid with commercial hypoglycemic drugs in streptozotocin induced diabetic rats. **Phytomedicine**, v. 20, p. 488-494, 2013.

PRADO, A. **Composição fenólica e atividade antioxidante de frutas tropicais**. 2009. 107 f. Dissertação (Mestrado em Ciências, Área de concentração: Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009.

PRASAD, S.; TYAGI, A. K.; AGGARWAL, B. B. Recent Developments in Delivery, Bioavailability, Absorption and Metabolism of Curcumin: the Golden Pigment from Golden Spice. **Cancer Research and Treatment**, v. 46, n. 1, p. 2-18, 2014.

PRATES, A. B. et al. Avaliação da Filtração Glomerular Através da Medida da Cistatina C Sérica. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, v. 29, n. 1, p. 48-55, 2007.

RE, R. et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 26, p. 1231-1237, 1999.

REDDY, B. V. et al. Antihyperlipidemic effect of bis-1,7-(2-hydroxyphenyl)-hepta-1,6-diene-3,5-dione, a curcumin analog, on nicotine and streptozotocin treated rats. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 335, p. 249-254, 2010.

ROBINSON, T. P. et al. Design, Synthesis, and Biological Evaluation of Angiogenesis Inhibitors: Aromatic Enone and Dienone Analogues of Curcumin. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, n. 13, p. 115-117, 2003.

RUKKUMANI, R. et al. Comparative effects of curcumin and an analog of curcumin on alcohol and PUFA induced oxidative stress. **Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences**, v. 7, n. 2, p. 274-283, 2004.

RUPASINGHE, H. P. V. et al. Red-fleshed apple as a source for functional beverages. **Canadian Journal of Plant Science**, v. 90, p. 95-100, 2010.

SANDE-LEE, S.; VELLOSO, L. A. Disfunção hipotalâmica na obesidade. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, n. 56, v. 6, p. 342-350, 2012.

SANTOS, N. S. J. et al. Albumina sérica como marcador nutricional de pacientes em hemodiálise. **Revista de Nutrição**, v. 17, n. 3, p. 339-349, 2004.

SARKHAIL, P. et al. Antidiabetic effect of *Phlomis anisodonta*: Effects on hepatic cells lipid peroxidation and antioxidant enzymes in experimental diabetes. **Pharmacological Research**, v. 56, p. 261-266, 2007.

SELVAM, C. et al. Design, synthesis, biological evaluation and molecular docking of curcumin analogues as antioxidant, cyclooxygenase inhibitory and anti-inflammatory agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 15, p. 1793-1797, 2005.

SHANG, Y. et al. Antioxidant capacity of curcumin-directed analogues: Structure-activity relationship and influence of microenvironment. **Food Chemistry**, v. 119, p. 1435-1442, 2010.

SHARMA, J. et al. Synthesis and antioxidante appraisal of curcumin and two curcuminoid compounds. **Der Pharmacia Sinica**, v. 4, n. 3, p. 151-163, 2013.

SHARMA, O. P.; BHAT, T. K. DPPH antioxidant assay revisited. **Food Chemistry**, v. 113, n. 4, p. 1202-1205, 2009.

SHELMA, R.; SHARMA, C. P. *In vitro* and *in vivo* evaluation of curcumin loaded lauroyl sulphated chitosan for enhancing oral bioavailability. **Carbohydrate Polymers**, v. 95, n. 1, p. 441-448, 2013.

SHISHODIA, S.; CHATURVEDI, M. M.; AGGARWAL, B. B. Role of curcumin in cancer therapy. **Current Problems in Cancer**, v. 31, n. 4, p. 243-305, 2007. Disponível em: <[http://cdn.elsevier.com/assets/pdf\\_file/0006/115719/current-problems-in-cancer-article-1.pdf](http://cdn.elsevier.com/assets/pdf_file/0006/115719/current-problems-in-cancer-article-1.pdf)>. Acesso em: 12 ago. 2013.

SHISHODIA, S.; SETHI, G.; AGGARWAL, B. B. Curcumin: getting back to the roots. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1056, p. 206-217, 2005.

SILVA, M. et al. Efeito da estreptozotocina sobre os perfis glicêmico e lipídico e o estresse oxidativo em hamsters. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, n. 55, v. 1, p. 46-53, 2011.

SINGH, U. et al. Reactions of reactive oxygen species (ROS) with curcumin analogues: Structure-activity relationship. **Free Radical Research**, v. 45, n. 3, p. 317-325, 2011.

SOETIKNO, V. et al. Curcumin prevents diabetic cardiomyopathy in streptozotocin-induced diabetic rats: Possible involvement of PKC-MAPK signaling pathway. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 47, p. 604-614, 2012.

SOETIKNO, V. et al. Curcumin decreases renal triglyceride accumulation through AMPK-SREBP signaling pathway in streptozotocin-induced type 1 diabetic rats. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 24, p. 796-802, 2013.

SOUSA, R. A. L.; NAVARRO, F. Breve relato da diabetes tipo II e sua relação com o metabolismo de lipídeos, o exercício resistido e os efeitos deste: quebrando dogmas. **Revista Brasileira de Prescrição e Fisiologia do Exercício**, v. 7, n. 42, p. 489-500, 2013.

SUBRAMANIAM, D. et al. DiphenylDifluoroketone: A Curcumin Derivative with Potent *In vivo* Anticancer Activity. **Cancer Research**, v. 68, p. 1962-1969, 2008.

SURYANARAYANA, P. et al. Effect of turmeric and curcumin on oxidative stress and antioxidant enzymes in streptozotocin-induced diabetic rat. **Medical Science Monitor**, v. 13, n. 12, p. 286-292, 2007.

TAMVAKOPOULOS, C. et al. Metabolism and Anticancer Activity of the Curcumin analogue, Dimethoxycurcumin. **Clinical Cancer Research**, v. 13, p. 1269-1277, 2007.

TIVERON, A. P. **Atividade antioxidante e composição fenólica de legumes e verduras consumidos no Brasil**. 2010. 103 f. Dissertação (Mestrado em Ciências, Área de concentração: Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

TOMREN, M. A. et al. Studies on curcumin and curcuminoids XXXI. Symmetric and asymmetric curcuminoids: Stability, activity and complexation with cyclodextrin. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 338, p. 27-34, 2007.

VASCONCELOS, S. M. L. et al. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de danos oxidativos em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Química Nova**, v. 30, n. 5, p. 1323-1338, 2007.

VENKATESAN, P.; RAO, M. N. A. Structure-Activity Relationships for the Inhibition of Lipid Peroxidation and the Scavenging of Free Radicals by Synthetic Symmetrical Curcumin Analogues. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 52, p. 1123-1128, 2000.

VOLP, A. C. P.; RENHE, I. R. T.; STRINGUETA, P. C. Pigmentos naturais bioativos. **Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v. 20, n. 1, p. 157-166, 2009.

WEBER, W. M. et al. Anti-oxidant activities of curcumin and related enones. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 13, p. 3811-3820, 2005.

WHO, World Health Organization. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2014/lancet-ageing-series/es/>. Acesso em: 12 nov. 2014a.

WHO, World Health Organization. Disponível em: <http://www.who.int/diabetes/en/>. Acesso em: 18 nov. 2014b.



WHO, World Health Organization. Disponível em: [http://www.who.int/diabetes/action\\_online/basics/en/index1.html](http://www.who.int/diabetes/action_online/basics/en/index1.html). Acesso em: 19 dez. 2014c.

YADAV, S. K. et al. Turmeric (curcumin) remedies gastroprotective action. **Pharmacognosy Review**, v. 7, n. 13, p. 42-46. 2013.

YOUSSEF, K. M. et al. Synthesis of Curcumin Analogues as Potential Antioxidant, Cancer Chemopreventive Agents. **Arch. Pharm. Pharm. Med. Chem.**, v. 337, p. 42-54, 2004.

ZHAO, W. et al. Curcumin ameliorated diabetic neuropathy partially by inhibition of NADPH oxidase mediating oxidative stress in the spinal cord. **Neuroscience Letters**, v. 560, p. 81-85, 2014.