

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ

EDUARDO MAKYAMA ALVES

**ANÁLISE COMPARATIVA DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA E
ANTIOXIDANTE ENTRE A CURCUMINA PURA E CURCUMINA NITRADA
ENCAPSULADAS EM PVP**

CAMPO MOURÃO

2023

EDUARDO MAKYAMA ALVES

**ANÁLISE COMPARATIVA DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA E
ANTIOXIDANTE ENTRE A CURCUMINA PURA E CURCUMINA NITRADA
ENCAPSULADAS EM PVP**

**COMPARATIVE ANALYSIS OF ANTI-INFLAMMATORY AND ANTIOXIDANT
ACTIVITY BETWEEN PURE CURCUMIN AND NITRATED CURCUMIN
ENCAPSULATED IN PVP**

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentada como requisito para obtenção do título de Licenciado em Licenciatura em Química da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR).

Orientador(a): Regiane da Silva Gonzalez

Coorientador(a): Debora Cristina de Souza

CAMPO MOURÃO

2023



[4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

Esta licença permite compartilhamento, remixe, adaptação e criação a partir do trabalho, mesmo para fins comerciais, desde que sejam atribuídos créditos ao(s) autor(es). Conteúdos elaborados por terceiros, citados e referenciados nesta obra não são cobertos pela licença.

EDUARDO MAKYAMA ALVES

**ANÁLISE COMPARATIVA DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA E
ANTIOXIDANTE ENTRE A CURCUMINA PURA E CURCUMINA NITRADA
ENCAPSULADAS EM PVP**

Trabalho de conclusão de curso de graduação
apresentada como requisito para obtenção do título de
Licenciado em Licenciatura em Química da
Universidade Tecnológica Federal do Paraná
(UTFPR).

Data de aprovação: 30/Novembro/2023

Regiane da Silva Gonzalez
Doutorado
Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Debora Cristina de Souza
Doutorado
Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Paula Cavalcante Monteiro
Doutorado
Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Daniela Aline Barancelli
Doutorado
Universidade Tecnológica Federal do Paraná

CAMPO MOURÃO

2023

Dedico este trabalho à minha família e aos que
participaram de todo o processo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que participaram desta jornada/etapa da minha vida e se, por um lapso, me esquecer de alguém, perdão.

Obrigado orientadora Regiane da Silva Gonzalez e Coorientadora Debora Cristina de Souza pelo conhecimento e aprendizado.

Gratidão à minha família pelo apoio.

Obrigado aos amigos e colegas que surgiram durante o curso (Bruna, Sara, Diran, João Victor, Renan e Paula) pela companhia.

Agradeço ao Edson pela ajuda e companhia durante a pesquisa.

Obrigado também os contatos que foram feitos fora da sala de aula, com os técnicos de laboratório (Kassia, Moacir e Marcelo), motorista do ônibus que fazia o trajeto da cidade em que moro para a universidade, e etc.

Aos professores do curso pelo aprendizado e conhecimento passado, gratidão também.

Aos amigos da minha cidade (Carlos Daniel, Felipe, Leonardo, Orlando, Carol, Gustavo, Mizon, "TB", todos), obrigado pela companhia.

Agradeço ao Laboratório Multiusuário do Campus Campo Mourão da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos (PPGTA), à Central de análise da UTFPR do Campus de Pato Branco e ao Grupo de Pesquisa em Eletroquímica da Universidade Estadual do Centro Oeste em Guarapuava, pelas análises que foram realizadas.

Agradeço à Fundação Araucária pela bolsa concedida e ao CNPq, ao TED/MEC e à UTFPR pelo auxílio à pesquisa.

RESUMO

A curcumina é um polifenol cristalino presente na cúrcuma (utilizado em medicina tradicional, corante de alimento e tempero em alguns países) que possui algumas atividades benéficas aos ser humano, como atividades antibacterianas, antioxidantes e anti-inflamatórias, mas possui algumas limitações por causa de sua estrutura ser hidrofóbica, termicamente instável entre outros fatores. Como modo de potencializar as atividades benéficas da curcumina, objetivou-se adicionar o grupo nitro em sua estrutura. A nitração de compostos aromáticos é uma reação conhecida e utilizada na química industrial. Desse modo, esta pesquisa teve como objetivo comparar a atividade antioxidante e anti-inflamatória da curcumina pura e nitrada, com o intuito de auxiliar pesquisas relacionadas à utilização de curcumina como tratamento e redução do estresse oxidativo. Inicialmente, foi realizada a reação de substituição eletrofílica aromática para realizar a nitração da curcumina. Para confirmar o produto desejado, foram realizadas análise de cromatografia em camada delgada, bem como análises de IV e UV-Vis. Em seguida a curcumina pura e nitrada foram encapsuladas para melhorar o desempenho dos curcuminóides, pois ficam solúveis em água, melhorando sua dispersão e bioatividade. Também foram realizadas análises com os encapsulados através de MEV, DSC e eficiência de encapsulação. Após a encapsulação, foi avaliado o efeito da redução do estresse oxidativo através da avaliação do percentual de atividade antioxidante com solução metanólica de DPPH, a avaliação da capacidade de inibição da peroxidação lipídica do homogenato obtido da gema de ovo e a análise da atividade anti-inflamatória pela desnaturação da ovalbumina, cujos resultados foram analisados estatisticamente. Como resultado da síntese foram observados picos característicos da formação do grupo nitro no produto (curcumina nitrada) no espectro IV e mudança na leitura do espectro UV-Vis, bem como na análise cromatográfica em camada delgada. A encapsulação foi feita de maneira satisfatória resultando em alta porcentagem de encapsulação. Além disso, o desempenho das curcuminas (pura e nitrada) nas análises de redução do estresse oxidativo por DPPH, peroxidação lipídica e desnaturação da ovalbumina demonstraram que ambas as moléculas possuem desempenho similares. Com isso, pode-se dizer que a curcumina teve seu desempenho melhorado pelo processo de encapsulação e pode ser utilizada como tratamento alternativo para redução do estresse oxidativo, além de apresentar atividade antioxidante e anti-inflamatória que contribui para pesquisas envolvendo o mesmo tema no futuro.

Palavras-chave: curcumina; encapsulação; estresse oxidativo; nitração.

ABSTRACT

Curcumin is a crystalline polyphenol present in turmeric (used in traditional medicine, food coloring and seasoning in some countries) that has some beneficial activities for humans, such as antibacterial, antioxidant and anti-inflammatory activities, but has some limitations because of its structure is hydrophobic, thermally unstable, among other factors. As a way to enhance the beneficial activities of curcumin, the aim was to add the nitro group to its structure. The nitration of aromatic compounds is a known reaction used in industrial chemistry. Therefore, this research aimed to compare the antioxidant and anti-inflammatory activity of pure and nitrated curcumin, with the aim of assisting research related to the use of curcumin as a treatment and reduction of oxidative stress. Initially, the electrophilic aromatic substitution reaction was carried out to carry out the nitration of curcumin. To confirm the desired product, thin layer chromatography analysis was performed, as well as IR and UV-Vis analyses. Then, pure and nitrated curcumin were encapsulated to improve the performance of curcuminoids, as they are soluble in water, improving their dispersion and bioactivity. Analyzes were also carried out with the encapsulated materials using SEM, DSC and encapsulation efficiency. After encapsulation, the effect of reducing oxidative stress was evaluated by evaluating the percentage of antioxidant activity with methanolic DPPH solution, evaluating the ability to inhibit lipid peroxidation of the homogenate obtained from egg yolk and analyzing the anti-oxidation activity. inflammatory process due to the denaturation of ovalbumin, the results of which were statistically analyzed. As a result of the synthesis, characteristic peaks of the formation of the nitro group in the product (nitrated curcumin) were observed in the IR spectrum and a change in the reading of the UV-Vis spectrum, as well as in the thin layer chromatographic analysis. Encapsulation was performed satisfactorily, resulting in a high percentage of encapsulation. Furthermore, the performance of curcumins (pure and nitrated) in the analyzes of oxidative stress reduction by DPPH, lipid peroxidation and ovalbumin denaturation demonstrated that both molecules have similar performance. Therefore, it can be said that curcumin's performance was improved by the encapsulation process and can be used as an alternative treatment to reduce oxidative stress, in addition to presenting antioxidant and anti-inflammatory activity that contributes to research involving the same topic in the future.

Keywords: curcumin; encapsulation; oxidative stress; nitration.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	9
2	OBJETIVO	12
2.1	Objetivo geral	12
2.2	Objetivo específico	12
3	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	13
3.1	Curcumina	13
3.2	Atividades biológicas da curcumina	14
3.3	Processo de nitração	14
3.4	Processos inflamatórios e estresse oxidativo	15
3.5	Análise de atividade antioxidante	17
3.6	Nanoencapsulação	22
4	MATERIAIS E MÉTODOS	24
4.1	Desenvolvimento e caracterização da curcumina nitrada	24
4.1.1	Processo de nitração da curcumina	24
<u>4.1.1.1</u>	<u>Caracterização estrutural por cromatografia em camada delgada</u>	<u>25</u>
4.1.2	Caracterização estrutural e físico-química dos compostos sintetizados	25
<u>4.1.2.1</u>	<u>Espectroscopia de IV e UV-Vis</u>	<u>26</u>
<u>4.1.2.2</u>	<u>Ponto de fusão</u>	<u>26</u>
4.1.3	Processo de encapsulação	26
<u>4.1.3.1</u>	<u>Caracterização dos encapsulados</u>	<u>26</u>
4.2	Avaliação da redução do estresse oxidativo	28
4.2.1	Avaliação do percentual de atividade antioxidante (AA%)	28
4.2.2	Avaliação da capacidade de inibição da peroxidação lipídica	29
4.2.3	Análise da atividade anti-inflamatória <i>in vitro</i> por meio da desnaturação da ovalbumina	31
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES	34
5.1	Desenvolvimento e caracterização da curcumina nitrada	34
5.1.1	Curcumina nitrada	34
5.1.2	Caracterização estrutural e físico-química dos compostos sintetizados	38
<u>5.1.2.1</u>	<u>Espectroscopia de IV e UV-Vis</u>	<u>38</u>
<u>5.1.2.2</u>	<u>Ponto de fusão</u>	<u>41</u>
5.1.3	Processo de encapsulação	42
5.2	Avaliação da redução do estresse oxidativo	44

5.2.1	Avaliação do percentual de atividade antioxidante (AA%).....	44
5.2.2	Avaliação da capacidade de inibição da peroxidação lipídica.....	45
5.2.3	Análise da atividade anti-inflamatória <i>in vitro</i> por meio da desnaturação da ovalbumina.....	47
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	49
	REFERÊNCIAS	50

1 INTRODUÇÃO

A curcumina é um polifenol hidrofóbico cristalino originado da cúrcuma (*Curcuma longa*) utilizada em medicinas tradicionais, corante alimentício e temperos utilizados em países asiáticos como China, Índia e Japão (Santos, 2015).

A curcumina apresenta propriedades antimicrobianas, além de atividades antioxidantes e anti-inflamatórias e capacidade de modular a ação de enzimas importantes como a que está envolvida no equilíbrio colinérgico (Ravindran, 2007). A curcumina é capaz de inibir a produção de mediadores inflamatórios e regular as vias de sinalização inflamatória, apresentando resultados significativos em pesquisas pré-clínicas/clínicas sobre artrite, psoríase, depressão e COVID-19 (Peng *et al.*, 2021). Todas estas propriedades demonstram o grande potencial de uso farmacológico.

A atividade antioxidante da curcumina é atribuída à presença dos dois grupamentos fenólicos em sua estrutura, sendo considerada, portanto, um polifenol. Os polifenóis são divididos em quatro classes principais sendo a curcumina pertencente a classe flavonoide (Manach *et al.*, 2004).

Especificamente os flavonóides possuem estrutura ideal para sequestro de radicais em razão de fatores como estabilidade do radical flavonil formado, interrompimento do processo de oxidação, e por funcionarem como doador de hidrogênio e elétron, etc. (Barreiros; David; David, 2006; Sousa *et al.*, 2007).

Na literatura são publicados artigos abordando a atividade da curcumina e de análogos curcuminóides. A título de exemplo, observa-se que foram encontradas em três bases de dados, no período de 2010 a 2013, 107 publicações que se referem à tratamentos alternativos à base de *Curcuma longa* devido às suas atividades anticarcinogênica e antidiabética (Marmitt *et al.*, 2016).

Algumas pesquisas têm se debruçado sobre o efeito da modificação da estrutura da curcumina nas propriedades bioativas. Hahm *et al.*, (2002), por exemplo, em sua pesquisa comparativa entre derivados da curcumina, cita uma molécula de curcumina contendo o grupo nitro ligado ao anel aromático de sua estrutura, e que apresentou um desempenho 90 vezes superior a curcumina padrão em relação a inibição do complexo fos-jun-DNA, agindo como agente quimioterápico.

Nesta pesquisa, foi realizado o processo de nitração da curcumina para a união do grupo NO₂ com a molécula de curcumina e avaliação das atividades anti-inflamatória e antioxidante. A nitração de compostos aromáticos é uma reação

química orgânica clássica e já possui utilidade na produção de produtos farmacêuticos, entre os quais destacamos o paracetamol e a fenacetina (Imamura, 2000). Neste sentido, esta pesquisa teve como objetivo avaliar se a presença do grupo nitro é capaz de potencializar o desempenho da molécula.

Com relação a atividade anti-inflamatória, nesta pesquisa utilizou-se como base a inibição da desnaturação da obalbumina (Rocha, 2021).

Uma vez que o processo inflamatório também está relacionado ao estresse oxidativo devido ao acúmulo de espécies reativas que aumentam a inflamação por causa da ativação de fatores de transcrição que estão relacionados ao processo inflamatório (Peng *et al.*, 2021), é de fundamental importância a avaliação da atividade antioxidante.

Com relação à atividade antioxidante, moléculas bioativas realizam tal processo através da abstração de hidrogênio ou/e pela transferência de elétron. Nesta pesquisa, foram utilizados métodos de avaliação de atividade antioxidante que se baseiam em técnicas *in vitro* através da reação com 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) e por meio da determinação da oxidação de uma molécula alvo (lipídios) (Lima, 2008).

A determinação da atividade antioxidante pela reação com DPPH é muito utilizada por ser uma metodologia de alta confiabilidade, rapidez no processo e estabilidade na ausência de luz, baseando a sua reação na descoloração da solução de DPPH (Sucupira *et al.*, 2012; Pires *et al.*, 2017).

A análise por peroxidação lipídica pode ser descrita como um processo em que espécies químicas oxidantes, radicais livres ou não, atacam ácidos graxos poli-insaturados, resultando na formação de radicais peroxila e hidroperóxidos lipídicos, sendo um deles o malondialdeído (Barrera *et al.*, 2018). O malondialdeído (MDA) formado nesta reação é utilizado como biomarcador na avaliação do estresse oxidativo no método de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). Neste método, a intensidade da coloração avermelhada/rósea é proporcional a peroxidação lipídica (Arnhold; Heck, 2014; Sucupira *et al.*, 2012). Logo, a análise foi feita por meio da redução da peroxidação lipídica, em que tal aduto MDA-TBA não é formado.

Todas as análises bioativas da curcumina gerada no processo de nitração foram realizadas após o processo de encapsulação da mesma em matrizes de poli(vinil pirrolidona) PVP. Este processo é de fundamental importância visto que apesar de todas as propriedades bioativas da curcumina há algumas limitações de uso devido a insolubilidade em água, instabilidade térmica e degradação à luz (Feldhaus, 2018;

Santos, 2015). A encapsulação, além de permitir a suspensão do fármaco em meio aquoso – o que facilita a aplicação e a biodisponibilidade do princípios ativos (Hu *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2013; Meng *et al.*, 2015; Rawat *et al.*, 2006) – , também potencializa o desempenho das propriedades bioativas (Li *et al.*, 2013; Martins *et al.*, 2013; Yang *et al.*, 2017).

Os resultados das análises realizadas demonstraram que a curcumina pura e nitrada apresentam atividades anti-inflamatórias e antioxidantes. Com pouca variância significativa de resultado quando comparado a curcumina pura e a que passou pelo processo de nitração, a presença do grupo nitro foi capaz de potencializar a capacidade de inibição da peroxidação lipídica da curcumina quando observado os resultados obtidos.

Além disso, os resultados obtidos auxiliam de maneira positiva pesquisas relacionadas à atividade antioxidante e anti-inflamatória da curcumina e sua utilização como tratamento/fármaco alternativo e redução do estresse oxidativo.

2 OBJETIVO

2.1 Objetivo Geral

Esta pesquisa teve como objetivo, por meio da comparação das atividades antioxidantes e anti-inflamatórias da curcumina nitrada com a curcumina normal, auxiliar as pesquisas relacionadas à utilização da curcumina como tratamento para redução do estresse-oxidativo.

2.2 Objetivo Específico

Encapsular as curcuminas para melhor desempenho nas análises;

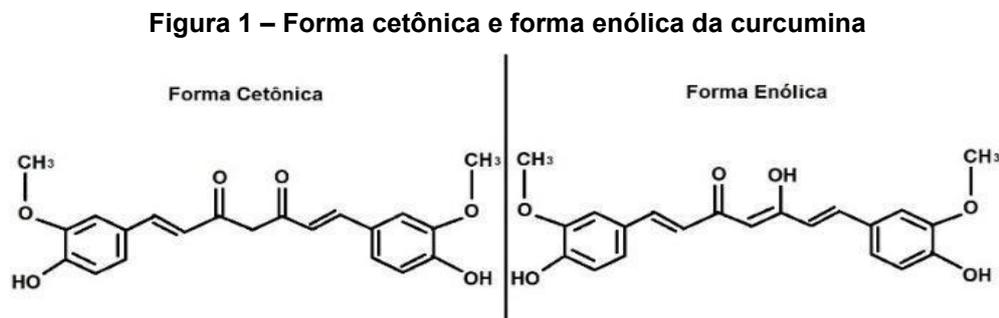
Comparar a atividade antioxidante e anti-inflamatória entre a curcumina nitrada e a curcumina padrão.

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 Curcumina

A curcumina é um polifenol hidrofóbico cristalino obtido da cúrcuma (*Curcuma longa*) que é utilizada como tempero, corante para alimentos e medicina tradicional em países asiáticos, como Japão, Índia e China, por exemplo. A curcumina é encontrada na cúrcuma em abundância, pois representa cerca de 60% da composição (Santos, 2015).

A estrutura de curcumina se trata de um derivado dos flavonóides e tem como sua nomenclatura (1E,6E)-1,7-bis-(4-hidroxi-3-metoxifenol)-hepta-1,6-dieno-3,5-diona, conhecida também como diferuloilmetano e fórmula molecular $C_{21}H_{20}O_6$, que possui tautomerismo ceto-enol, a forma ceto sendo formada predominantemente em meio ácido e neutro e a forma enol em meio alcalino (Wang *et al.*, 1997 apud Feldhaus, 2018). Sua estrutura na forma cetônica e enólica pode ser observada na figura a seguir:



De acordo com Santos (2015), a presença de insaturações conjugadas, como as duplas ligações da parte alceno, bem como presença das hidroxilas dos anéis aromáticos na estrutura da curcumina, conferem à mesma efeitos benéficos para o ser humano, como atividades antioxidantes, anti-inflamatórias e antibacterianas.

Mas, baseando-nos no postulado de Cecilio-filho *et al.* (2000 apud Feldhaus, 2018), é possível afirmarmos que a curcumina possui algumas limitações em função de sua estrutura ser hidrofóbica, instável a temperaturas superiores a 180°C , sofrer fotodegradação e ser pouco absorvida pelo organismo humano, o que a caracteriza como um composto bioativo de baixa disponibilidade.

3.2 Atividades biológicas da curcumina

Utilizando três bases de dados no período de 2010 a 2013, Marmitt *et al.*, (2016) desenvolveu uma pesquisa na qual encontrou 107 publicações que se referem ao uso da *Curcuma longa* para tratamentos alternativos de patologias anticarcinogênica e antidiabética.

Selvi (2015), em sua pesquisa, analisou se a curcumina atenua o estresse oxidativo e ativa quinases sensíveis ao processo redox em ratos da raça *Wistar* com dieta contendo alto teor de gordura e frutose. Foram observados resultados satisfatórios, contribuindo na exploração do potencial da curcumina no manejo do estresse oxidativo induzido pela dieta e como um agente adjuvante terapêutico contra complicações relacionadas à diabetes e obesidade.

Smith *et al.*, (2010) analisou a capacidade da curcumina inibir efeitos relativos a fibrose em fibroblastos de fibrose pulmonar idiopática (FPI), em que foi observado que a curcumina intraperitoneal reduziu a progressão da fibrose, o que contribuiu e encorajou para que mais estudos da curcumina como uma alternativa de tratamento da FPI surgissem.

Hahm *et al.*, (2002) fez uma comparação entre derivados da curcumina obtidos em seu experimento, no qual é citado um derivado curcuminóide que possui em sua estrutura o grupo nitro ligado ao anel aromático com desempenho de inibição do complexo fos-jun-DNA, 90 vezes superior a curcumina padrão, agindo assim como um possível agente quimioterápico.

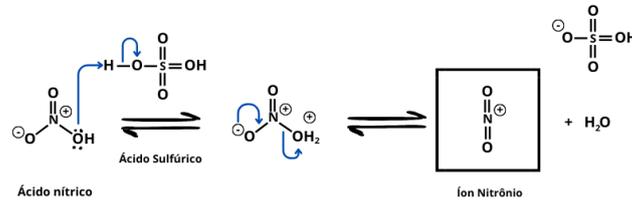
3.3 Processo de nitração

Observando os resultados de Hahm *et al.*, (2002) e o análogo da curcumina que possui o grupo NO₂ ligado em sua estrutura, objetivou-se, nesta pesquisa, o estudo da relação entre tal estrutura e o estresse oxidativo e a avaliação do desempenho como agente antioxidante e anti-inflamatório.

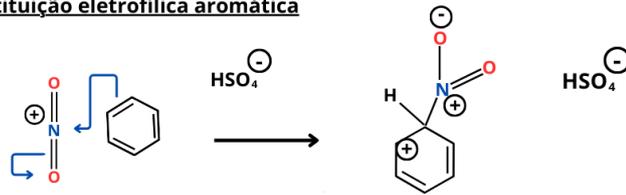
O processo de nitração de compostos aromáticos (Figura 2) consiste inicialmente na ativação do grupo nitro (que ocorre a partir da mistura de ácido nítrico e ácido sulfúrico), e posterior ataque nucleófilo do anel aromático, o que resulta em um carbocátion intermediário (íon arênio) e então finalização com a desprotonação por uma base fraca, para que se restaure a aromaticidade do composto (Ashenhurst, 2022).

Figura 2 – Nitração de anel aromático

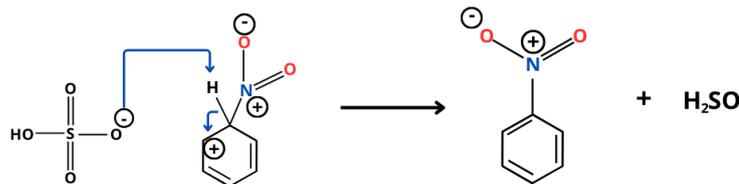
Formação do íon nitrônio



Substituição eletrofilica aromática



Desprotonação



Fonte: Adaptado de Ashenhurst (2022).

As reações químicas de nitração têm grande importância na química industrial, pois são utilizadas para a preparação de intermediários moleculares para as indústrias de corantes/tintas e para produtos da indústria farmacêutica que estão relacionados com a estrutura do paracetamol, ácido pícrico, fenacetina, etc (Imamura, 2000).

3.4 Processos inflamatórios e estresse oxidativo

Os processos inflamatórios são uma resposta fisiológica do organismo perante algumas doenças como infecção viral/microbiana, alterações genéticas e estresse, sendo classificadas como inflamações crônicas e agudas (Conte *et al.*, 2017).

A via inflamatória consiste em quatro partes: sensores, indutores, mediadores e efetores (Peng *et al.*, 2021). Os mecanismos patológicos e fisiológicos da inflamação são causados por diferentes gatilhos inflamatórios e não foram padronizadas, mas, em geral, os efeitos das drogas incluem ação nos receptores e vias sinalizadoras,

regulando a resposta dos tecidos-alvo aos mediadores inflamatórios (Peng *et al.*, 2021).

O tratamento para febre, dores e inflamações geralmente é feito pelo uso de anti-inflamatórios não-esteróides (AINE), em que o fármaco mais popular é o diclofenaco, aprovado para uso em 120 países desde 1975, ao passo que nos Estados Unidos está na 30ª posição entre os 200 principais medicamentos receitados (Bandarage *et al.*, 2000).

Porém, Bandarage *et al.*, (2000) comenta que o uso crônico de AINEs pode provocar alguns efeitos colaterais, tais como náuseas, dor abdominal, vômitos e diarreia. Conte *et al.*, (2017) complementa que o uso contínuo de AINEs causa problemas como falência renal, dores de cabeça e irritação gástrica.

Pesquisas mostram que ocorrem mais de 70.000 hospitalizações e 7.000 mortes anuais somente nos Estados Unidos por causa dos efeitos adversos dos AINEs (Bandarage *et al.*, 2000).

Neste sentido, o uso da curcumina para tratamento de doenças inflamatórias apresenta vantagem quando comparado aos AINEs por ser uma molécula bioativa não tóxica e com atividade potencializada (Bandarage *et al.*, 2000).

Peng *et al.*, (2021) comenta que a curcumina exerce efeitos anti-inflamatórios por meio da inibição da produção de mediadores inflamatórios e na regulação das vias de sinalização inflamatória, apresentando resultados significativos em um grande número de pesquisas pré-clínicas/clínicas realizadas sobre seu efeito em doenças inflamatórias como artrite, psoríase, depressão, COVID-19 e doença inflamatória intestinal.

O processo inflamatório também está relacionado ao estresse oxidativo, pois com o acúmulo de espécies reativas, aumenta a inflamação por causa da ativação de fatores de transcrição que estão relacionados ao processo inflamatório (Peng *et al.*, 2021).

A curcumina possui a capacidade de diminuir a produção de espécies reativas de oxigênio causados pelo estresse oxidativo por causa de sua atividade antioxidante (Peng *et al.*, 2021).

Conforme pontuam Barbosa *et al.*, (2010), o estresse oxidativo é caracterizado pelo desequilíbrio de compostos oxidantes e antioxidantes, em que se favorece a formação excessiva de radicais livres ou a velocidade de remoção destes radicais fica comprometida. Essa situação contribui para que as biomoléculas se oxidem e percam

funções biológicas ou então ocasione o desequilíbrio homeostático manifestado em danos em células e tecidos.

De acordo com Silva (2018), quando ocorre a injúria tecidual o organismo, visando o tratamento da injúria, desencadeia os processos de inflamação, estresse oxidativo e regulação da degradação, e a expressão da matriz extracelular. Geralmente após a injúria ser tratada, ocorre a inibição da expressão da matriz extracelular e o tecido consegue restabelecer sua homeostasia, fazendo um reparo adaptativo.

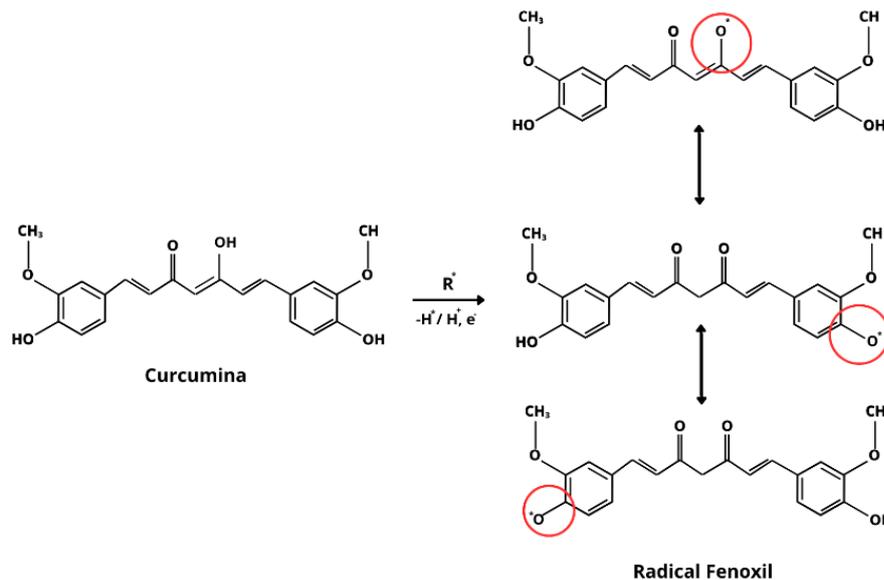
3.5 Análise de atividade antioxidante

A atividade antioxidante da curcumina pode ser atribuída ao fato de ser um polifenol, pois apresenta os dois anéis aromáticos ligados à hidroxila. Os polifenóis são divididos em quatro classes principais (ácido fenólico, lignanas, flavonóides e estilbenos), sendo a curcumina pertencente à classe flavonoide (Manach *et al.*, 2004).

Especificamente os flavonóides possuem estrutura ideal para sequestro de radicais, tornando-os por isso mais eficientes que a vitamina C e E, em razão de cinco fatores: (I) estabilidade do radical flavonil formado, (II) reatividade quando está na presença de outro antioxidante, (III) funciona como doador de hidrogênio e elétron (consequentemente interrompendo o processo de oxidação), (IV) interação com membranas e (V) capacidade de quelar metais de transição (Barreiros; David; David, 2006; Sousa *et al.*, 2007).

As moléculas que atuam como antioxidantes realizam tal processo através da abstração de hidrogênio ou pela transferência de elétron. A curcumina em sua forma enólica tem em sua estrutura três sítios ativos que podem sofrer oxidação pelos dois modos, porém pesquisas sugerem que o hidrogênio de maior facilidade para extração da curcumina pertence ao grupo fenólico, resultando na formação do radical fenoxil (muito estável e menos reativo) (Borges *et al.*, 2019). A formação deste radical pode ser observada a seguir:

Figura 3 – Formação do radical fenoxil da curcumina



Fonte: Adaptado de Oliveira (2015).

Existem vários métodos de determinação da atividade antioxidante em sistemas biológicos e alimentos, tendo como semelhança em todos os casos a presença de um substrato adequado, um agente oxidante e a medida do ponto final (Lima, 2008).

Lima (2008) comenta que tais métodos se dividem em dois grupos. O primeiro deles é baseado na captura de radicais livres por meio da técnica analítica de Espectrometria de Ressonância de *spin* de elétrons (ESR) que não é muito utilizado por causa do alto custo dos instrumentos. Já o outro grupo se baseia em técnicas *in vitro* por meio da determinação da oxidação de uma molécula alvo (lipídios e proteínas por exemplo), formando grupos carbonila e detectados espectrofotometricamente.

A determinação espectrofotométrica da atividade antioxidante pela reação com 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) é muito utilizada por causa de fatores positivos, tais como a alta confiabilidade, rapidez no processo e estabilidade na ausência de luz. Esta reação se baseia na descoloração da solução de DPPH (radical orgânico de nitrogênio estável e livre por causa dos elétrons desemparelhados) (Sucupira *et al.*, 2012; Pires *et al.*, 2017), cuja estrutura molecular pode ser observada na figura a seguir:

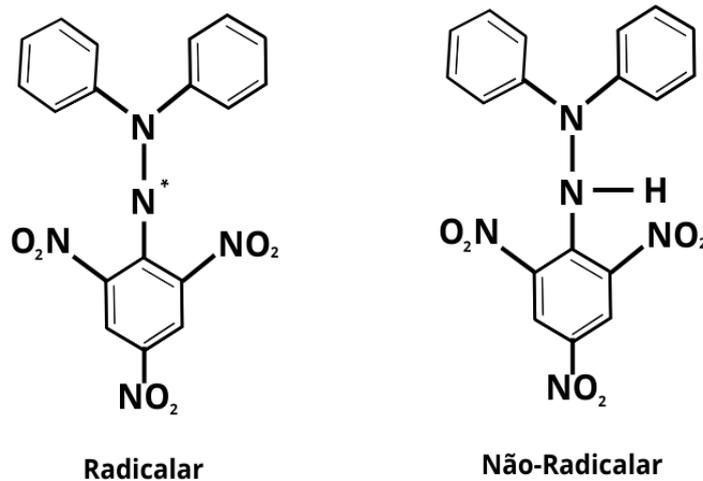
Figura 4 – Estrutura molecular do DPPH



Fonte: Adaptado de Oliveira (2015).

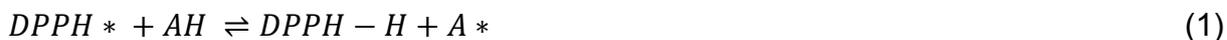
Quando é adicionado uma substância doadora de átomos de hidrogênio em uma solução de DPPH, ocorre a mudança da coloração de púrpura para violeta claro ou amarelo pálido por causa da redução da forma radicalar do DPPH para a não-radicalar, reduzindo-o e formando assim a hidrazina (Alves *et al.*, 2010; Sucupira *et al.*, 2012). As estruturas não-radicalar e radicalar da molécula de DPPH podem ser observadas na figura 5:

Figura 5 – Estrutura radicalar e não-radicalar do DPPH



Fonte: Adaptado de Oliveira (2015).

O mecanismo de reação para determinação da capacidade antioxidante de um composto envolve a transferência de um átomo de hidrogênio para a redução ou neutralização de radical livre relacionado ao DPPH, conforme demonstrado a seguir:



Por causa da coloração observada na solução de DPPH ser púrpura ou violeta, a leitura da absorção deve ser feita na região de 515 a 528 nm (Alves *et al.*, 2010).

De acordo com Oliveira (2015), a solução geralmente é feita com solvente orgânico e em meio alcoólico, pois dessa maneira a transferência de átomo de hidrogênio para o nitrogênio do DPPH ligado aos dois anéis benzênicos é facilitada.

O monitoramento da análise deve ser feito no escuro, pois a luz interfere diretamente na reação do radical DPPH causando a perda de aproximadamente 20% a 35% da absorbância entre a solução de DPPH e o antioxidante, e, conseqüentemente, interferindo no resultado final do experimento (Oliveira, 2015).

Outro modo de determinação de atividade antioxidante é por meio do método de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), sendo utilizado na avaliação de dano causado pelo estresse oxidativo. O método consiste na quantificação de malondialdeído (MDA), que é originado por meio da peroxidação de ácidos graxos poliinsaturados ou lipoperoxidação (LPO) do material estudado, através do uso de agente oxidante específico (Arnhold; Heck, 2014; Barrera *et al.*, 2018).

A peroxidação lipídica pode ser descrita como um processo em que espécies químicas oxidantes, radicais livres ou não radicais, atacam lipídios que possuem uma ou mais ligação dupla entre carbonos. Neste ataque ocorre a abstração do hidrogênio de um átomo de carbono e, ao se inserir oxigênio (meio oxidante), conseqüentemente, há a formação de radicais peroxila e hidroperóxidos lipídicos (Barrera *et al.*, 2018), conforme pode ser observado a seguir:

presente na amostra, uma vez que não é seletivo ao MDA, reagindo também com outros componentes que são formados no meio reacional (Bertolin *et al.*, 2011).

3.6 Nanoencapsulação

Considerando a estrutura e as propriedades da curcumina é necessário que as limitações de uso, devido a insolubilidade em água, instabilidade térmica e degradação à luz (Feldhaus, 2018; Santos, 2015), não interfiram na aplicação da mesma devido à baixa absorção e biodisponibilidade.

Compostos fitoquímicos, como a curcumina, apresentam baixa absorção e biodisponibilidade em razão do grande tamanho molecular e alteração farmacocinética (em caso de medicamento oral). Para contornar estas limitações é possível utilizar formulações com curcumina nanoparticulada aumentando de maneira significativa a biodisponibilidade e bioatividade (Yallapu; Jaggi; Chauhan, 2012).

A nanotecnologia tem sido utilizada para o desenvolvimento de sistemas de liberação de compostos bioativos e dispositivos que aumentam a eficácia terapêutica de moléculas bioativas. Estes sistemas de liberação possuem a capacidade de aumentar a biodisponibilidade farmacológica possibilitando a atuação em sítios específicos, além de reduzir efeitos toxicológicos (Yallapu; Jaggi; Chauhan, 2012).

Os sistemas de liberação podem ser obtidos de vários materiais, a exemplo dos sistemas nanoparticulados compostos por polímeros, que apresentam grande eficiência e versatilidade, podendo originar nanopartículas, nanocápsulas e micela, as quais atuam como reservatório carreadores de compostos bioativos (Silva *et al.*, 2017).

Por meio da encapsulação é conferido ao material encapsulado estabilidade a variação de pH, temperatura, luz e umidade, permitindo também a liberação controlada de fármacos e compostos bioativos no organismo humano. Logo, as substâncias com propriedades de interesse (no caso desta pesquisa, a curcumina) são transportadas por meio de nanopartículas que evitam sua degradação ao longo do percurso e facilitam sua absorção no organismo e, conseqüentemente, aumentam sua biodisponibilidade (Li *et al.*, 2013; Martins *et al.*, 2013; Yang *et al.*, 2017).

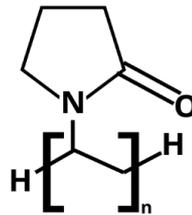
Uma das técnicas de encapsulação de compostos bioativos consiste na formação de dispersão (nanodispersão), em que o composto e o polímero são adicionados em um solvente que solubiliza ambas substâncias de maneira simultânea, através do processo de sonicação, em que é induzido a interação entre o

polímero e as moléculas encapsuladas, cujo processo finaliza com a evaporação do solvente (Ezhilarasi *et al.*, 2013).

Karavas *et al.*, (2006) comenta que o modo de ação da curcumina depende do sistema de liberação que é utilizado, podendo exibir mecanismos de toxicidades diferentes e reduzir transporte de elétrons. O material encapsulante influencia diretamente na afinidade da curcumina pela água em dispersão sólida, em que estudos *in vivo* mostraram aumentos de solubilidade em água em até 5 (cinco) vezes (Seo *et al.*, 2012).

Um dos polímeros mais utilizados como material encapsulante é o poli (vinil pirrolidona) (PVP) (Bajpai; Chand; Ahuja, 2015; Shlar *et al.*, 2017; Silva *et al.*, 2017; Yen *et al.*, 2010). Sua estrutura pode ser observada na Figura 8:

Figura 8 – Estrutura molecular da poli (vinil pirrolidona)



Fonte: Autoria própria (2023).

Tal polímero tem destaque por características como: boa solubilidade em água e em solventes orgânicos convencionais, alta biocompatibilidade, adesividade e por estabelecer ligações químicas com diversos compostos de maneira eficiente (Shpotyuk *et al.*, 2016). Outro fator que faz o PVP ser um material promissor em aplicações industriais e biotecnológicas vem de sua não toxicidade, o que permite a utilização do mesmo como estabilizante na indústria alimentícia (Gupta; Chen; Lee, 2015).

Paradkar *et al.*, (2004) e Seo *et al.*, (2012) utilizaram o PVP para a produção de dispersão sólida de curcumina, em que foi observado o aumento na afinidade da curcumina pela água, em comparação com encapsulante derivado de celulose, o que resultou em maior concentração de curcumina em fase aquosa.

Neste sentido, esta pesquisa tem como objetivo o uso de PVP como encapsulante da curcumina e da curcumina nitrada para posterior avaliação das propriedades bioativas em experimentos *in vitro*.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Desenvolvimento e caracterização da curcumina nitrada

4.1.1 Processo de nitração da curcumina

A síntese da curcumina nitrada foi realizada conforme metodologia proposta por Liu (2019), com adaptações. Utilizando um erlenmeyer de 50 mL, foi preparado uma solução de curcumina dissolvida em diclorometano 2%(m/V) sobre a qual foi gotejado lentamente uma mistura reacional composta por ácido nítrico e ácido sulfúrico 50% (v/v) na proporção de 6 equivalentes molares em relação a massa de curcumina (1E, 6E)-1,7-bis-(4-hidroxi-3-metoxifenol)-hepta-1,6-dieno-3,5-diona. Uma vez que a reação é exotérmica, a mistura foi mantida em banho de gelo (temperatura entre 10°e 15°C), conforme figura a seguir:

Figura 9 – Reação para a síntese da curcumina nitrada



Fonte: Autoria própria (2023).

Em seguida, o produto foi neutralizado através de lavagem com solução aquosa supersaturada de bicarbonato de sódio, seguido de filtração sob pressão reduzida utilizando trap de segurança. Vejamos:

Figura 10 – Filtração a vácuo da reação



Fonte: Autoria própria (2023).

Em seguida, o resíduo sólido da filtração foi seco em estufa a 37° C por 24 horas. Com relação a nitrocurcumina, a comprovação da nitração foi realizada por cromatografia em camada delgada durante o processo.

4.1.1.1 Caracterização estrutural por cromatografia em camada delgada

Para a análise de cromatografia de camada delgada foi utilizado como fase móvel uma solução de acetato de etila e diclorometano (50% v/v) e placa de cromatografia em camada delgada e sílica G/ UV254 (0,20 mm) como fase estacionária sendo calculado o fator de retenção por meio da seguinte equação:

$$R_f = d_c/d_s \quad (2)$$

Em que R_f é o fator de retenção, d_c a distância percorrida pela substância e d_s a distância percorrida pela fase móvel.

4.1.2 Caracterização estrutural e físico-química dos compostos sintetizados

A caracterização estrutural e físico-química dos compostos sintetizados nesta pesquisa foi realizada através da avaliação espectroscópica (IV e UV-VIS) e determinação do ponto de fusão.

4.1.2.1 Espectroscopia de IV e UV-Vis

Uma pequena amostra do produto obtido da nitração e da curcumina padrão foi pastilhada separadamente em KBr sob pressão de 6 Ton e então avaliada entre 400 e 4000 cm^{-1} utilizando o aparelho IRAffinity-1 da marca *Shimadzu* localizado no laboratório do Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos (PPGTA) na Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR) – *Campus* Campo Mourão.

Realizou-se a análise no espectrofotômetro UV-Vis de ambas (curcumina padrão e nitrada) em que foi utilizado como solvente o etanol em concentração de 0,05 g/L, sendo realizada a varredura de 200 a 650 nm no aparelho Red Tide USB-650-UV-VIS que está localizado no laboratório do Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos (PPGTA) na Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR) – *Campus* de Campo Mourão.

4.1.2.2 Ponto de fusão

Realizou-se a análise do ponto de fusão da curcumina nitrada e padrão por meio do aparelho PF1500 FARMA da marca *Gehaka* localizado no laboratório G001 da UTFPR do *Campus* de Campo Mourão, na qual a amostra foi macerada e colocada em capilares para a leitura no aparelho.

4.1.3 Processo de encapsulação

A encapsulação do curcuminóide foi executada de acordo com a metodologia descrita por Almeida *et al.* (2018), em que uma solução etanólica de polivinilpirrolidona (PVP) com a curcumina nitrada (ou curcumina padrão) na proporção mássica de 1/10 foi agitada em um ultra turrax (3 (três) vezes por 3 (três) minutos, com intervalos de 1 (um) minuto entre cada agitação). Após, o solvente foi evaporado em estufa para obtenção do encapsulado, o qual foi particulado por moagem para armazenamento (-10°C) e posterior caracterização térmica, morfológica e bioativa.

4.1.3.1 Caracterização dos encapsulados

Os encapsulados foram caracterizados através de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) e eficiência de encapsulação.

A análise por MEV foi feita utilizando o microscópio eletrônico VEGA3 da marca *Tescan* com detector SE e filamento de tungstênio a 20kV e WD de 10 a 15 mm. As imagens foram obtidas pelo Grupo de Pesquisa em Eletroquímica na Universidade Estadual do Centro Oeste – UNICENTRO, localizada na cidade de Guarapuava.

A análise de DSC foi realizada na Central de Análise localizada na UTFPR - *Campus* Pato Branco. Adaptando a metodologia de Silva (2016), as amostras de curcumina padrão e nitrada (encapsuladas) foram colocadas em cadinhos de alumínio e fechadas, sendo analisada as transições térmicas devido ao aquecimento entre 25°C e 200°C (20°C.min⁻¹) e fluxo de nitrogênio de 50 mL.min⁻¹. O aparelho utilizado foi o modelo Q20, da TA *instruments*.

A eficiência de encapsulação (EE%) foi analisada a partir da metodologia de Buzanello (2013), com adaptações. Em tubos eppendorf a curcumina padrão encapsulada e curcumina nitrada encapsulada foram dissolvidas separadamente em etanol e acetona (concentração de ~4,60 g/L) e agitadas manualmente 10 (dez) vezes. Em seguida, as amostras foram analisadas no espectrofotômetro (Modelo IL-226-NM-BI da marca *Kasuki* localizado no laboratório G001 da UTFPR do *Campus* de Campo Mourão) em 420 nm para as amostras dissolvidas com acetona e 427 nm para as dissolvidas em etanol. O experimento foi realizado em triplicata, sendo realizada a construção de curva de calibração para obtenção dos valores das concentrações das soluções avaliadas. As amostras dissolvidas em acetona foram utilizadas para determinar a quantidade de curcumina que não foi encapsulada, enquanto que as amostras dissolvidas em etanol foram utilizadas para determinação do total de curcumina que foi encapsulada. Com isto, o cálculo para saber a EE% foi feito a partir da seguinte equação:

$$EE\% = \frac{(m_{Encap} - m_{livre})}{m_{Encap}} \quad (3)$$

Sendo m_{Encap} a massa calculada do total de curcumina padrão/nitrada que foi encapsulada e m_{livre} a massa da curcumina que dissolveu com a acetona e estava livre de encapsulação.

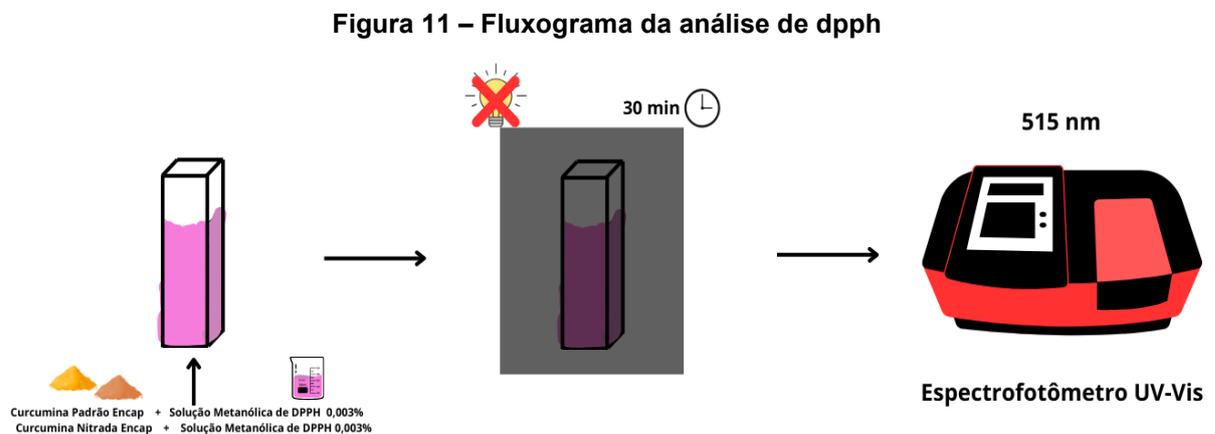
4.2 Avaliação da redução do estresse oxidativo

4.2.1 Avaliação do percentual de atividade antioxidante (AA%)

O procedimento foi feito de acordo com Nascimento *et al.*, (2011) com algumas adaptações, utilizando 4 concentrações diferentes para a curcumina padrão e para a curcumina nitrada (0,2 g/L; 0,15 g/L; 0,11 g/L e 0,0082 g/L) às quais foram misturadas com solução metanólica de 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH) (0,003%, m/V).

A mistura ficou em repouso no escuro por 30 (trinta) minutos e em seguida foi avaliada espectrofotometricamente em 515nm.

Um fluxograma desta análise pode ser observado na figura a seguir:



A capacidade de eliminar o radical DPPH tem como intuito determinar a porcentagem de atividade antioxidante (AA %), calculada através da seguinte equação:

$$AA\% = 100 \times \frac{A_{\text{controle}} - A_{\text{amostra}}}{A_{\text{controle}}} \quad (4)$$

Sendo A_{controle} a absorbância da solução de DPPH sem a amostra e A_{amostra} a absorbância da amostra com o DPPH.

Os dados obtidos foram tratados por análise de variância (ANOVA).

4.2.2 Avaliação da capacidade de inibição da peroxidação lipídica

O método foi adaptado de acordo com a metodologia proposta por Rocha (2021), que teve como referência Ohkawa, Ohishi e Yagi (1979). O método consiste na avaliação espectrofotométrica da capacidade de inibição da peroxidação lipídica em solução de fosfolipídio de gema de ovo.

Para isto, inicialmente o fosfolipídio da gema do ovo foi extraído utilizando uma mistura de hexano e álcool isopropílico com a proporção de 3:2 (v/v). O extrato foi filtrado utilizando algodão como meio filtrante, sendo o filtrado colocado em uma placa de Petri para secar por 24h, no escuro, em capela de exaustão (Figura 12):

Figura 12 – Solução de fosfolipídio da gema do ovo secando



Fonte: Autoria própria (2023).

O resíduo obtido na placa foi dissolvido em água destilada (1% m/v), formando um homogenato que foi mantido protegido da luz para não haver oxidação.

Para a avaliação da capacidade de inibição da peroxidação lipídica da curcumina nitrada e da curcumina padrão, foram avaliadas três concentrações diferentes da amostra, conforme pode ser observado no Quadro 1:

Quadro 1 - Diferentes concentrações feitas para cada tipo de curcumina

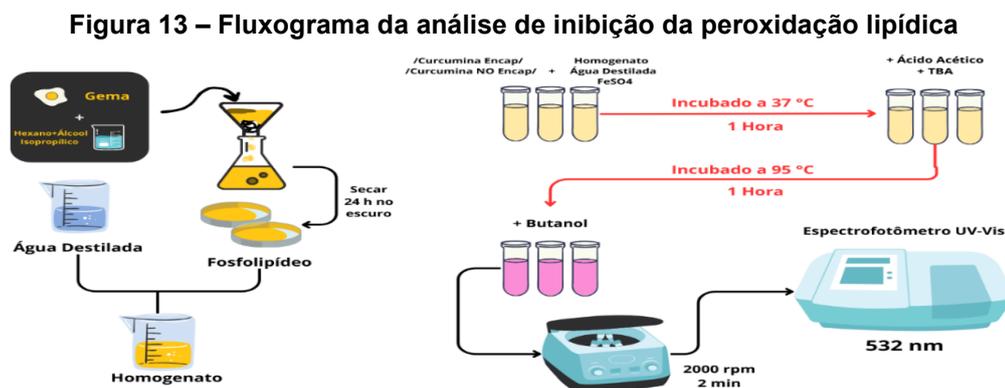
	Análises	H ₂ O (μL)	Homogenato (μL)	FeSO ₄ / x mol/L (μL)	Amostra (μL)
Curcumina Padrão	Concentração 1 (5 mg/mL)	120	80	10	200
	Concentração 2	220	80	10	100

	(1,05 mg/mL)				
	Concentração 3 (0,22 mg/mL)	270	80	10	50
Curcumina nitrada	Concentração 1 (5 mg/mL)	120	80	10	200
	Concentração 2 (1,05 mg/mL)	220	80	10	100
	Concentração 3 (0,22 mg/mL)	270	80	10	50
Controles	Negativo 1	330	80	-	-
	Negativo 2	130	80	-	200
	Positivo	320	80	10	-

Fonte: Autoria própria (2023).

Todas as misturas foram preparadas em triplicata e então foram incubadas com o homogenato da membrana de ovo a 37 °C por uma hora. Após este período de incubação foi adicionado em todos os tubos 400 µL de ácido acético (20% com pH 3) e 400 µL de solução aquosa de ácido tiobarbitúrico (TBA, 0,6% m/v) e novamente incubados em banho maria a 95°C por uma hora. Na etapa final, após a segunda incubação, foi adicionado 400 µL de butanol em todas as amostras as quais foram então centrifugadas a 2000 rpm por 2 (dois) minutos e em seguida analisadas espectrofotometricamente em 532 nm.

O fluxograma de como foi feita a análise pode ser observado na Figura 13:



Fonte: Autoria própria (2023).

Para o cálculo da atividade antioxidante foi utilizado a seguinte equação:

$$\% = 100 - \left[\left(\frac{CE_{amostra}}{CE_{controle}} \right) \times 100 \right] \quad (5)$$

Em que % é o percentual de inibição da peroxidação lipídica, $CE_{controle}$ concentração equivalente de malondialdeído presente no controle do ensaio (em que ocorreu 100% da peroxidação) e $CE_{amostra}$ a concentração equivalente de malondialdeído presente nas amostras.

Os valores das concentrações equivalentes de malondialdeído foram obtidos através da construção de uma curva padrão de concentrações conhecidas de malondialdeído (0,05 a 0,5 mmol/L), em que foi realizado o mesmo procedimento experimental, porém substituindo o homogenato e a solução de $FeSO_4$ pelo malondialdeído.

Os dados obtidos foram tratados por análise de variância (ANOVA).

4.2.3 Análise da atividade anti-inflamatória *in vitro* por meio da desnaturação da ovalbumina

A análise da atividade anti-inflamatória foi realizada de acordo com Rocha (2021) que teve como referência a metodologia criada por Singh e Patra (2018), modificada pelo Neto *et al.*, (2020). Iniciou-se o processo preparando a solução de ovalbumina solubilizando a clara de ovo fresco em uma solução tampão PBS (concentração de 5% e pH próximo de 6). Em seguida, foi realizada a análise em diferentes concentrações, como é possível observar no Quadro 2:

Quadro 2 – Concentrações de curcuminas feitas para a análise da atividade anti-inflamatória

	Análises	Solução de Ovalbumina (Clara + PBS) (µL)	PBS (µL)	Amostra (µL)
Curcumina Padrão	Concentração 1 20 mg/mL	750	100	150
	Concentração 2 5 mg/mL	750	150	100

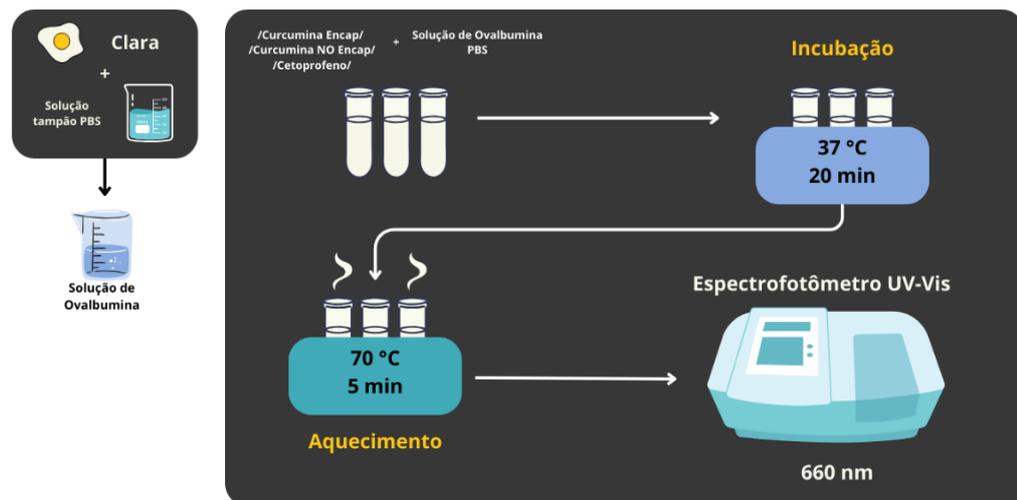
	Concentração 3 1,05 mg/mL	750	200	50
Nitro Curcumina	Concentração 1 20 mg/mL	750	100	150
	Concentração 2 5 mg/mL	750	150	100
	Concentração 3 1,05 mg/mL	750	200	50
Controles	Negativo	750	250	-
	Positivo (Cetoprofeno)	750	100	150

Fonte: Autoria própria (2023).

Todas as análises foram feitas em triplicata. Após a mistura, todos os tubos foram incubados a 37 °C em banho-maria por 20 (vinte) minutos e então aquecidos a 70 °C por 5 (cinco) minutos. Após este período as amostras foram deixadas esfriar e então foi medida a absorbância em 660 nm no espectrofotômetro.

O fluxograma desta análise pode ser observado na seguinte imagem:

Figura 14 – Fluxograma da análise de atividade anti-inflamatória



Fonte: Autoria própria (2023).

Para o cálculo de determinação do percentual de inibição atividade anti-inflamatória *in vitro* como resultado da desnaturação de proteína foi utilizada a seguinte equação:

$$\%inibição = 100 \times (Ac - At)/Ac \quad (6)$$

Em que At é a absorbância das amostras analisadas e Ac a absorbância do controle (Alhakmani *et al.*, 2014).

Os dados obtidos foram tratados por ANOVA.

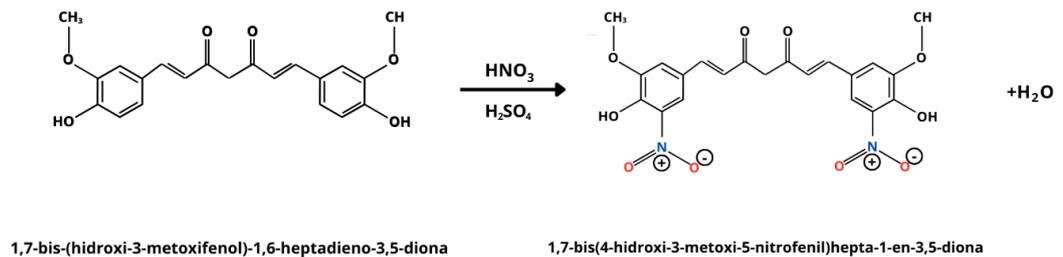
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Desenvolvimento e caracterização da curcumina nitrada

5.1.1 Curcumina nitrada

A Nitração da curcumina ocorreu através da seguinte reação:

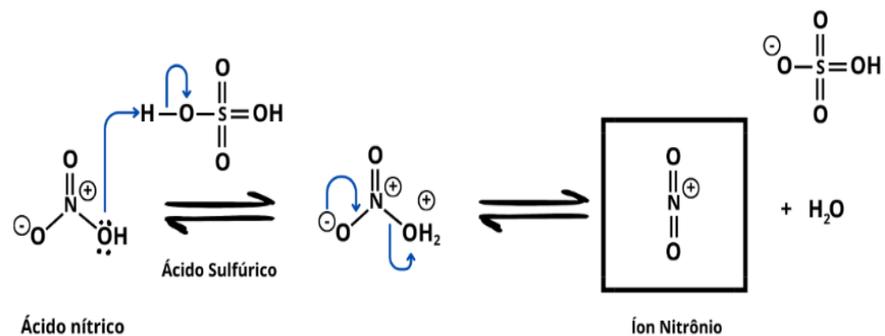
Figura 15 – Formação do íon nitrônio



Fonte: Autoria própria (2023).

Para que a reação ocorra é necessário que haja inicialmente a formação do íon nitrônio através da reação entre o ácido nítrico e o ácido sulfúrico, conforme demonstrado na Figura 16:

Figura 16 – Formação do eletrófilo nitrônio



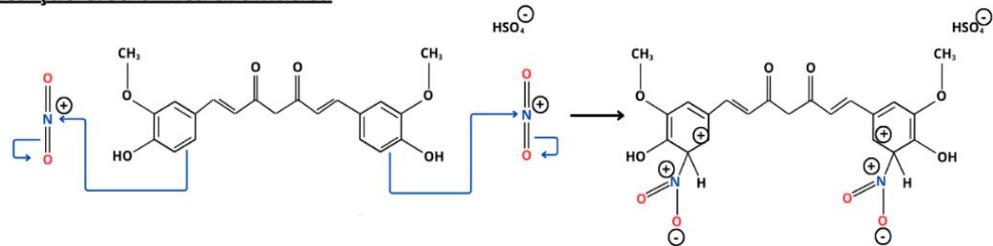
Fonte: Adaptado de Ashenhurst (2022).

Em seguida, o íon nitrônio é atacado por um par de elétrons pi do anel aromático da curcumina formando um carbocátion intermediário, em que origina a ligação C - N e ocorre a quebra da ligação C - C (pi) do anel aromático e N-O (pi) do íon nitrônio. Após a etapa da formação da ligação C - N, acontece a reação ácido-base, em que uma base fraca (neste caso, a água ou o íon HSO₄ liberados após a etapa de protonação do ácido nítrico) remove um próton do carbono que possui o

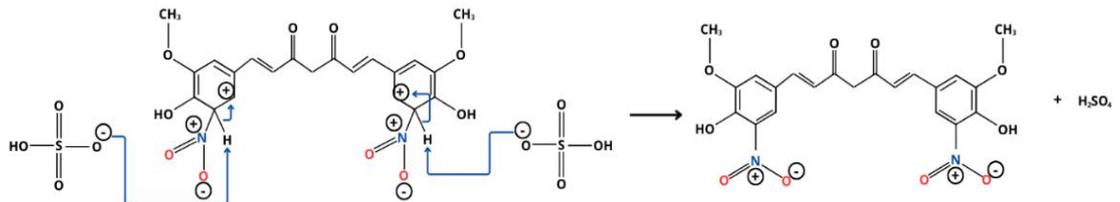
grupo nitro, causando a quebra da ligação C - H e reconstruindo a ligação C - C (π) do anel aromático, restaurando então a aromaticidade da curcumina (Ashenhurst, 2022). A etapas descritas podem ser observadas na figura a seguir:

Figura 17 – Etapas de substituição eletrofilica aromática e desprotonação

Substituição eletrofilica aromática



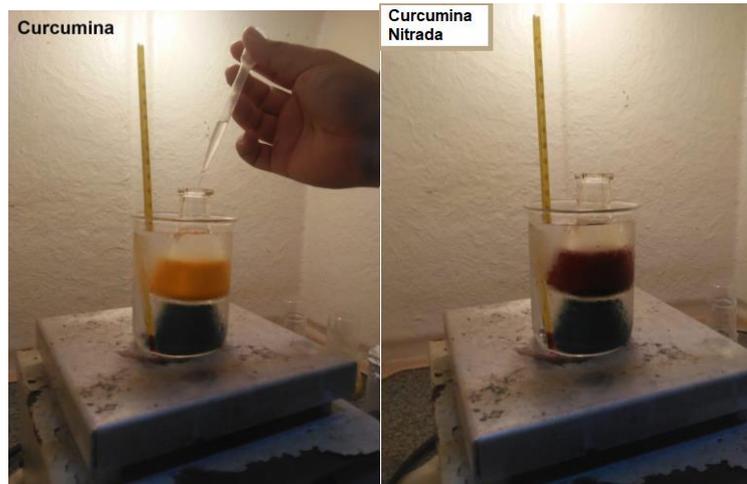
Desprotonação



Fonte: Adaptado de Ashenhurst (2022).

Como há o grupo OH (doador de elétrons) ligado aos anéis aromáticos da curcumina, a nitração será orientada em posição *orto* ou *para*. Como a posição *para* já está ocupada na estrutura da curcumina, o grupo nitro irá se ligar na posição *orto* em relação ao carbono com OH. Formando assim a molécula 1,7-bis(4-hidroxi-3-metoxi-5-nitrofenil)hepta-1-en-3,5-diona. Durante a etapa de adição da mistura reacional de ácido nítrico e ácido sulfúrico, é perceptível uma mudança na coloração do composto (Figura 18), a qual pode ser atribuída ao processo de nitração de um composto curcuminóide. O mesmo resultado foi obtido por Hahm *et al.*, (2002), em que um dos compostos que possuem em sua estrutura o grupo funcional nitro apresentou a coloração marrom-avermelhado característica.

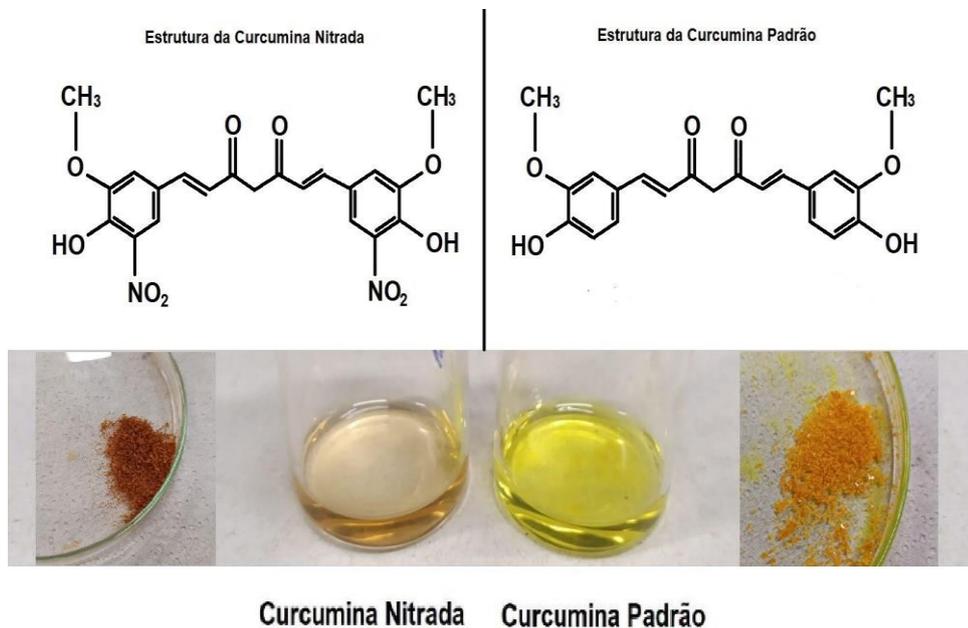
Figura 18 – Mudança da coloração da curcumina dissolvida durante os processos de nitração



Fonte: Autoria própria (2023).

A possível estrutura do produto formado e da curcumina padrão, bem como a coloração dos compostos na fase sólida e das soluções etanólicas, podem ser observadas na figura 19:

Figura 19 – Curcumina nitrada e padrão e representação de suas estruturas

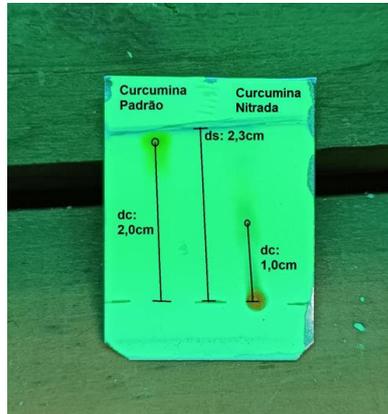


Fonte: Autoria própria (2023).

A presença de produto formado pode ser verificada por meio da comparação das manchas reveladas na cromatografia em camada delgada, devido a diferença

observada entre os fatores de retenção da curcumina padrão e curcumina nitrada (Figura 20).

Figura 20 – Cromatografia em camada delgada da curcumina padrão e nitrada



Fonte: Autoria própria (2023).

Sendo o fator de retenção da curcumina padrão:

$$Rf = dc/ds$$

$$Rf = 2,0/2,3$$

$$Rf = 0,869$$

(7)

E o fator de retenção da curcumina nitrada sendo:

$$Rf = 1,0/2,3$$

$$Rf = 0,434$$

(8)

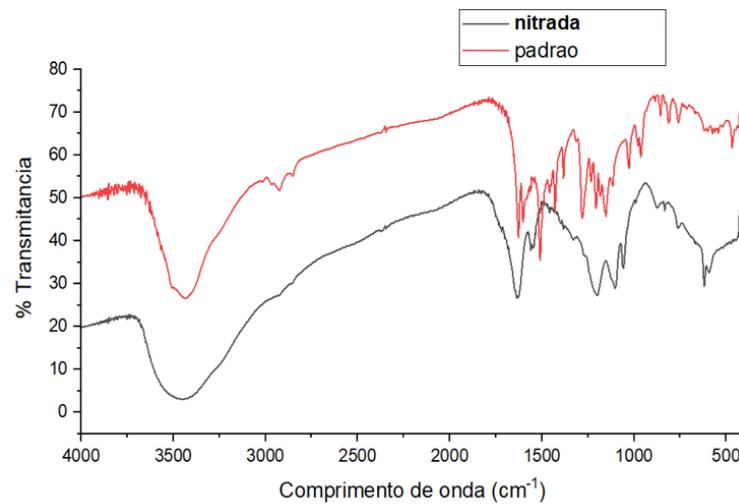
Estes resultados demonstram que houve mudança na estrutura da curcumina nitrada, pois a curcumina pura foi mais facilmente arrastada pela fase móvel enquanto que a curcumina nitrada ficou mais retida pela placa de cromatografia. Isso se dá por causa do grupo nitro adicionado em sua estrutura que aumentou sua polaridade e, conseqüentemente, melhorou sua interação com a fase estacionária.

5.1.2 Caracterização estrutural e físico-química dos compostos sintetizados.

5.1.2.1 Espectroscopia de IV e UV-Vis

Por meio da avaliação por espectrofotometria de IV (Figura 21) pode-se observar algumas diferenças entre o produto de síntese (nitrada, linha preta) e a curcumina padrão (padrão, linha vermelha).

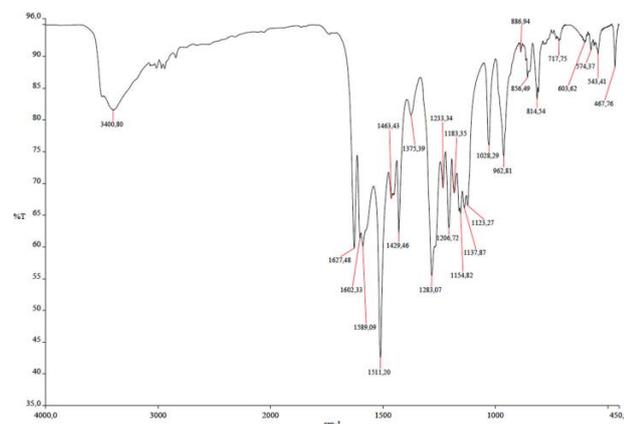
Figura 21 – Espectro infravermelho da curcumina padrão e nitrada



Fonte: Autoria própria (2023).

Para fins de comparação, foi utilizado um espectro de infravermelho obtido por Gonzalez-Albadalejo *et al.*, (2015) em que são demonstrados os picos característicos da curcumina padrão (Figura 22):

Figura 22 – Espectro infravermelho da curcumina padrão



Fonte: Gonzalez-Albadalejo *et al.*, (2015).

No Quadro 3 é possível comparar os picos característicos da curcumina nitrada.

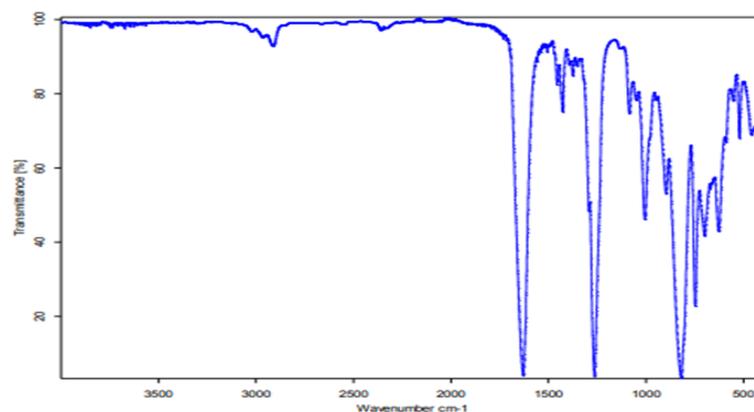
Quadro 3 – Sinais Observados no espectro IV da curcumina nitrada

Localização dos picos no comprimento de onda (cm^{-1})	Significado do sinal característico	Localização no espectro IV da curcumina que passou pelo processo de nitração
Banda entre 3508 a 3400	-OH	$\sim 3400 \text{ cm}^{-1}$
Pico em ~ 1597	Anel benzeno	$\sim 1559 \text{ cm}^{-1}$
Pico em ~ 1509	-C=C	Pequeno pico em $\sim 1507 \text{ cm}^{-1}$
Estiramento em ~ 1278	-C-O em anel aromático	$\sim 1272 \text{ cm}^{-1}$
Pico em ~ 1737	C=O	Descolado em $\sim 1630 \text{ cm}^{-1}$

Fonte: Contini *et al.*, (2015).

Contini *et al.*, (2015) caracteriza em seu artigo os sinais do grupo NO_2 quando observado o espectro infravermelho da nitroglicerina (Figura 23), em que os picos são especificados no Quadro 4.

Figura 23 – Espectro infravermelho da nitroglicerina



Fonte: Contini *et al.*, (2015).

Quadro 4 – Sinais no espectro infravermelho que caracterizam o grupo funcional NO₂

Localização dos picos no comprimento de onda (cm⁻¹)	Grupo Funcional
1631	-NO ₂ Pico assimétrico
1457	-NO ₂ Pico assimétrico
1293	-NO ₂ Pico assimétrico
1264	-NO ₂ Pico assimétrico

Fonte: Contini *et al.*, (2015).

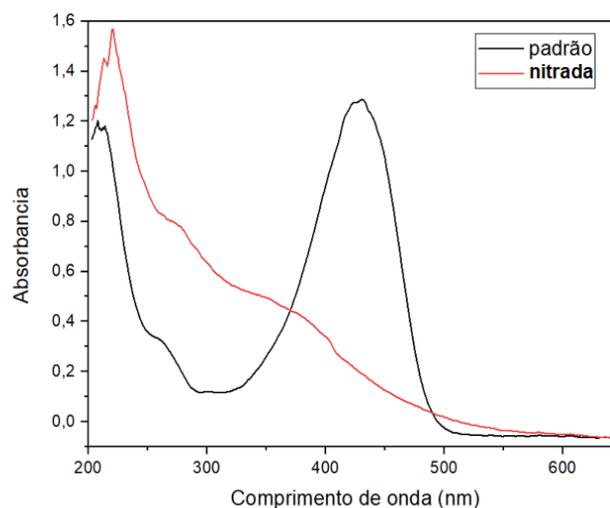
Pavia *et al.*, (2010) comenta que os sinais característicos do grupo funcional NO₂ podem estar presentes nos seguintes intervalos de comprimento de onda: 1550 a 1490 cm⁻¹ e 1355 a 1315 cm⁻¹.

Tendo como base os sinais do espectro e os intervalos em que podem aparecer os sinais característicos do grupo funcional NO₂, foi possível observar que os mesmos estão presentes no espectro de infravermelho das curcuminas que passaram no processo de nitração (Figura 21).

Os picos observados não estão com a mesma intensidade dos observados no artigo, porém, entende-se que foi originado a curcumina nitrada.

Com relação a avaliação espectrofotométrica de UV/VIS, os resultados obtidos podem ser observados na Figura 24:

Figura 24 – Espectro UV-Vis da curcumina padrão e a curcumina nitrada



Fonte: Autoria própria (2023).

Pode-se observar nítida alteração do comportamento de absorção entre as moléculas de curcumina padrão e nitrada devido a presença do grupamento NO_2 . Como pode ser observado na figura 24, tanto para a curcumina padrão (curva preta) quanto para a curcumina nitrada (curva vermelha), existe a presença de uma banda primária referente ao anel aromático (transição p-p* para C=C) acima de 200 nm.

Entretanto, devido a presença do cromóforo nitro (NO_2) ligado ao anel, ocorre deslocamento batocrômico de 210 nm (referente a grupamento fenólico) para 216 nm, o que confirma a mudança estrutural da molécula com adição do grupo nitro no anel aromático, provavelmente na posição *orto* em relação à hidroxila. A presença deste grupamento causa efeito batocrômico na região de absorção referente a transições n-p* (257 para 273 nm) bem como hiper Cromia em que a intensidade característica da banda secundária é aumentada.

5.1.2.2 Ponto de fusão

Foi realizada a análise do ponto de fusão da curcumina padrão e da curcumina nitrada no aparelho PF1500 FARMA da marca *Gehaka*, utilizando capilares com a amostra de cada um:

Figura 25 – Capilares com as amostras da curcumina padrão e nitrada



Fonte: Autoria própria (2023).

O ponto de fusão obtido para as amostras de curcumina padrão foi de aproximadamente 170,5°C enquanto que para a curcumina nitrada o ponto de fusão foi de aproximadamente 102°C. Com esta mudança no ponto de fusão, percebe-se que a curcumina que passou pelo processo de nitração mudou sua composição, se liquefazendo em uma temperatura menor que a da curcumina padrão.

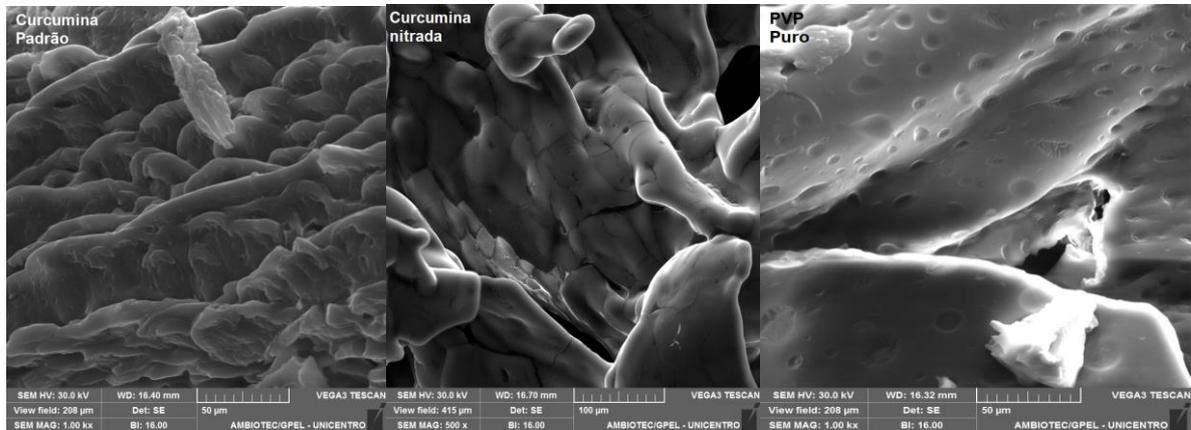
Entretanto, o ponto de fusão observado não condiz com o resultado observado por Hamh *et al.*, (2002) de 220 °C para um curcuminóide com estrutura similar. O aumento do ponto de fusão é explicado pela adição do grupo nitro na estrutura da molécula, o que favorece a ressonância do composto/resistência.

5.1.3 Processo de Encapsulação

Para comparação dos encapsulados foram observadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) o PVP puro, a curcumina pura encapsulada e a curcumina nitrada encapsulada.

Os resultados das análises de MEV podem ser observados na Figura a seguir.

Figura 26 – MEV dos encapsulados de PVP, curcumina padrão e curcumina nitrada

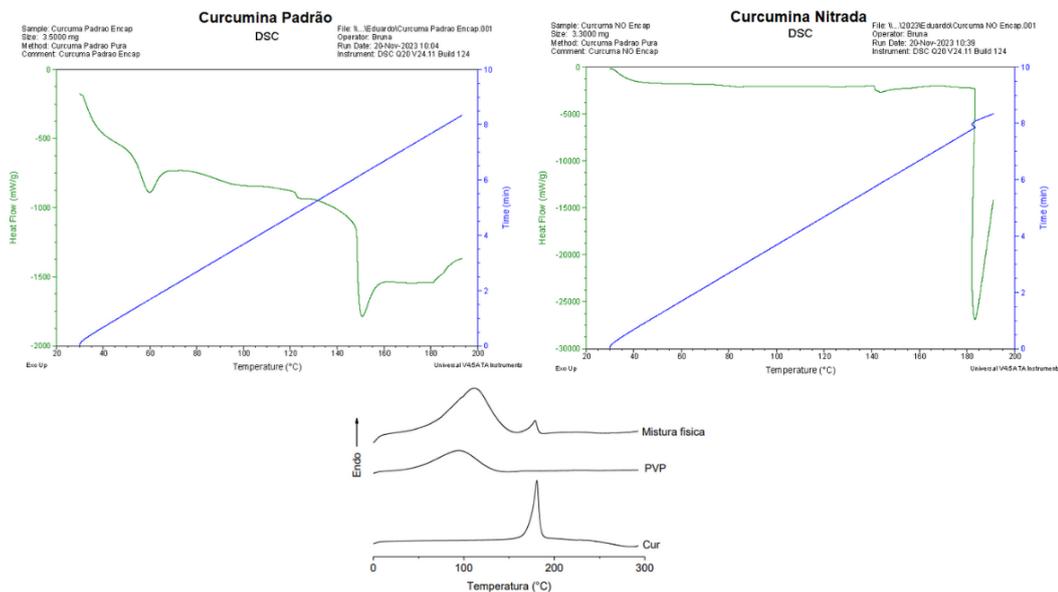


Fonte: Aurtoria própria (2023).

Percebe-se que a estrutura da curcumina nitrada e padrão encapsuladas ficaram semelhante ao PVP puro, e que durante o processo de secagem as amostras encapsuladas se agruparam resultando em um “filme” ao invés de ficarem separadas, sem, contudo, afetar a encapsulação.

Em relação à análise do DSC, por meio dos gráficos obtidos da curcumina padrão e nitrada que foram encapsuladas, quando comparado ao PVP analisado por Santos (2018), pode-se deduzir que ambas as moléculas apresentam-se na forma cristalina dentro da matriz polimérica, visto que o sinal característico da fusão destes compostos (pico em ~ 180 °C para o curcuminóide e pico alargado entre ~ 50 a ~ 100 °C para o PVP) estão presentes, respectivamente, para a curcumina pura e nitrada (Figura 27).

Figura 27 – Comparação das análises de DSC



Fonte: Adaptado de Santos (2018).

No cálculo de eficiência de encapsulação foram obtidos valores de 89,27% e 94,80% para a curcumina nitrada e curcumina padrão, respectivamente, demonstrando assim que o processo de encapsulação utilizado apresenta alta eficiência para ambas as moléculas.

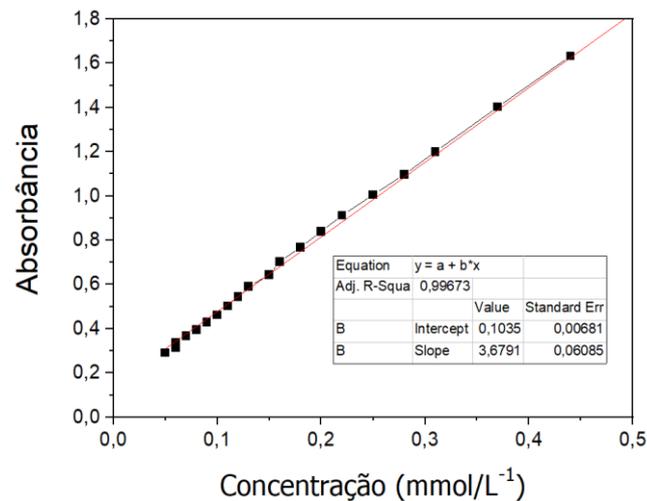
5.2 Avaliação da redução do estresse oxidativo

5.2.1 Avaliação do percentual de atividade antioxidante (AA%)

O resultado dos cálculos referente a avaliação da reação entre o DPPH e as curcuminas encapsuladas obtido pode ser observado na Figura 28, e indicam que tanto a curcumina pura quanto a que passou pelo processo de nitração possuem propriedades antioxidantes.

Logo, a curcumina agindo como agente antioxidante tem como objetivo reduzir a quantidade de MDA originado da peroxidação e, portanto, reduzir a coloração da amostra. A proporcionalidade da reação pode ser comprovada através da construção da curva de calibração do malondialdeído conforme pode ser observado na figura a seguir:

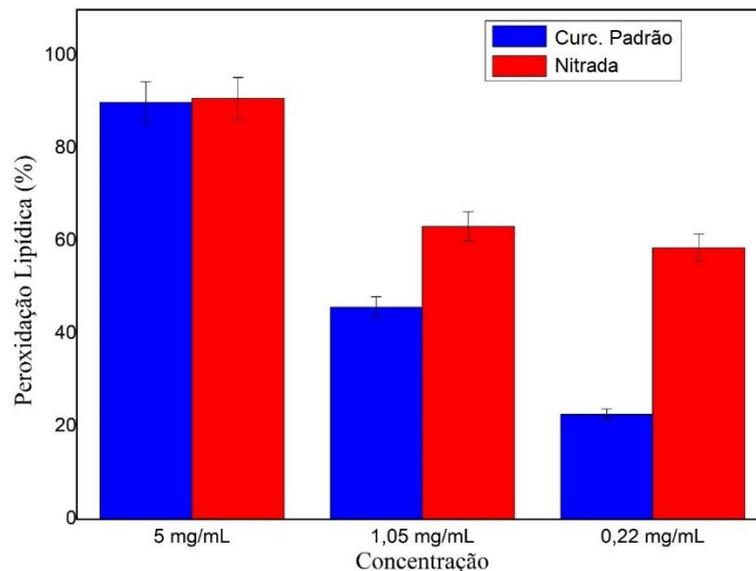
Figura 30 – Curva de calibração do malondialdeído



Fonte: Autoria própria (2023).

O resultado obtido para a análise de peroxidação pode ser observado na imagem abaixo:

Figura 31 – Gráfico da inibição da peroxidação lipídica



Fonte: Autoria própria (2023).

Percebe-se que em todas as concentrações a curcumina nitrada teve uma porcentagem maior de inibição da peroxidação lipídica. Porém, quando foram analisados os dados por ANOVA, observou-se que a variação da curcumina padrão e nitrada não foi significativa para a concentração de 5mg/mL. Com o F crítico de 5,79 e o F calculado de 8,55, para as menores concentrações, entende-se que houve variação significativa nos resultados, sendo graficamente visível quando comparado o desempenho da curcumina nitrada e a padrão.

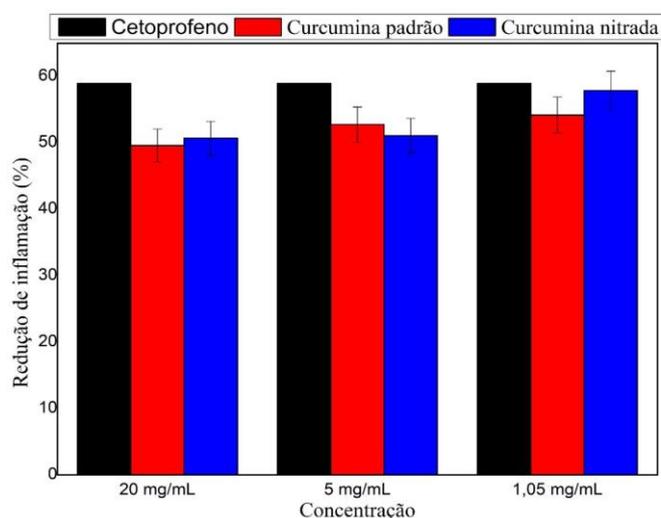
Tal diferença pode estar relacionada com a curcumina padrão, por se tratar de um composto fenólico (hidrogênio de maior facilidade para extração da curcumina) que em baixas concentrações atua como agente pro-oxidativo auxiliando a peroxidação lipídica, porém, o efeito se inverte com o aumento de concentração (Borges *et al.*, 2019; Rocha, 2021).

5.2.3 Análise da atividade anti-inflamatória *in vitro* por meio da desnaturação da ovalbumina

A atividade anti-inflamatória determinada por análise está relacionada à desnaturação da ovalbumina que é evidenciada pelo aumento da turbidez da solução depois de aquecido, causando a coagulação (Rocha, 2021).

O gráfico da comparação do percentual de redução da inflamação obtido neste procedimento pode ser visto na figura abaixo:

Figura 32 – Gráfico do percentual de redução da inflamação



Fonte: Autoria própria (2023).

Observou-se que o desempenho das curcuminas foi próximo ao obtido no controle positivo.

Por meio do gráfico percebe-se que a curcumina padrão em concentração maior (5 mg/mL) teve um maior percentual de redução quando comparado a curcumina nitrada, todavia, em concentrações menores, a curcumina nitrada teve maior percentual de redução que a curcumina padrão.

Por meio da análises dos dados por ANOVA, foi possível observar que quando ambas comparadas ao controle positivo (cetoprofeno) houve variação significativa (sendo o F crítico 5,14 e o F calculado 20,14); contudo, quando comparado entre a curcumina padrão e a curcumina nitrada, não foi significativo (F crítico: 7,708; F calculado: 0,044).

Os resultados sugerem que independentemente da concentração dos compostos analisadas não há influência no desempenho anti-inflamatório, demonstrando que a nitração do anel não interfere na atividade da curcumina nas condições experimentais testadas.

Contudo, é possível observar que tanto a curcumina pura quanto a nitrada possuem atividade anti-inflamatória, contribuindo em pesquisas que objetivam a utilização como métodos alternativos de tratamento de processos inflamatórios.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Pode-se concluir que o processo de encapsulação empregado foi capaz garantir alta eficiência de encapsulação, permitindo a realização das análises em meio aquoso.

Além disso, foi observado que tanto a curcumina nitrada quanto a curcumina padrão possuem atividade antioxidante e anti-inflamatória como citado em nossa fundamentação, porém não foi observado variação de resultados tão significativa quando comparadas. Tal resultado pode estar relacionado a diversos fatores, como a pequena margem de variação da concentração utilizada nos experimentos, por exemplo.

Ademais, em relação à nitração da curcumina, o produto pode ter o desempenho melhorado com a adição de alguma etapa de recristalização para remoção de possíveis impurezas presentes no produto da síntese.

Foi observado que ambas, curcumina pura e a curcumina nitrada, inibiram a peroxidação lipídica, e que, portanto, podem auxiliar no tratamento/redução do estresse oxidativo.

Tais resultados obtidos de atividade antioxidante e anti-inflamatória contribuem de maneira positiva para pesquisas futuras envolvendo o curcuminóide. Logo, pode-se afirmar que a curcumina possui potencial para ser utilizada em tratamentos que envolvem depuração tecidual e para redução do estresse oxidativo.

REFERÊNCIAS

ALHAKMANI, F.; KHAN, S. A.; AHMAD, A. Determination of total phenol, in-vitro antioxidant and anti-inflammatory activity of seeds and fruits of *Zizyphus spina-christi* grown in Oman. **Asian pacific journal of tropical biomedicine**, v. 4, p. S656–S660, 2014.

ALMEIDA, H. H. S. *et al.* Bioactive evaluation and application of different formulations of the natural colorant curcumin (E100) in a hydrophilic matrix (yogurt). **Food chemistry**, v. 261, p. 224–232, 2018.

ALVES, C. Q. *et al.* Métodos para determinação de atividade antioxidante in vitro em substratos orgânicos. **Química Nova**, v. 33, p. 2202-2210, 2010. Disponível em: <<https://www.scielo.br/j/qn/a/XS9CsdV86YbjrxfMjLGmXVL/?format=pdf&lang=pt>> Acesso em: 2 dez. 2023.

ARNHOLD, A. L.; HECK, T. G. Método de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (tbars), e sua importância para a avaliação da peroxidação lipídica em diversas aplicações. **Salão do Conhecimento**, Seminário de Iniciação Científica, Set. de 2014, Ijuí. Disponível em: <<https://www.publicacoeseventos.unijui.edu.br/index.php/salaoconhecimento/article/view/3423>> Acesso em: 2 dez. 2023.

ASHENHURST, J. Electrophilic aromatic substitutions (2) - nitration and sulfonation. **Master Organic Chemistry**. 2022. Disponível em: <<https://www.masterorganicchemistry.com/2018/04/30/electrophilic-aromatic-substitutions-2-nitration-and-sulfonation/>>. Acesso em: 31 out. 2023.

BAJPAI, S. K.; CHAND, N.; AHUJA, S. Investigation of curcumin release from chitosan/cellulose micro crystals (CMC) antimicrobial films. **International journal of biological macromolecules**, v. 79, p. 440–448, 2015.

BANDARAGE, U. K. *et al.* Nitrosothiol esters of diclofenac: Synthesis and pharmacological characterization as gastrointestinal-sparing prodrugs. **Journal of medicinal chemistry**, v. 43, n. 21, p. 4005–4016, 2000.

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

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

BARRERA, G. *et al.* Lipid peroxidation-derived aldehydes, 4-hydroxynonenal and malondialdehyde in aging-related disorders. **Antioxidants (Basel, Switzerland)**, v. 7, n. 8, p. 102, 2018.

BERTOLIN, T. E. *et al.* Ficocianina, tocoferol e ácido ascórbico na prevenção da oxidação lipídica em charque. **Brazilian Journal of Food Technology**, Passo Fundo, v. 14, p. 301-307, 2011. Disponível em: Acesso em: 2 dez. 2023.

BORGES, J. *et al.* Ação antioxidante da curcumina (cúrcuma longa L.) na injúria de isquemia e reperfusão tecidual. **Enciclopédia Biosfera**, v. 16, n. 29, p. 48–62, 2019.

BUZANELLO, R.A.S. **Nanoencapsulação de curcumina em polímeros biodegradáveis/biocompatíveis**. 2013. 110f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), Campo Mourão/Medianeira. 2013

CONTE, R. *et al.* Recent advances in nanoparticle-mediated delivery of anti-inflammatory phytochemicals. **International journal of molecular sciences**, v. 18, n. 4, p. 709, 2017.

CONTINI, A. E. *et al.* Low hazard small-scale synthesis and chemical analysis of high purity nitroglycerine (NG). **RSC advances**, v. 5, n. 106, p. 87228–87232, 2015.

EZHILARASI, P. N. *et al.* Nanoencapsulation techniques for food bioactive components: A review. **Food and bioprocess technology**, v. 6, n. 3, p. 628–647, 2013.

FELDHAUS, H.K. **Formação e caracterização de revestimentos comestíveis a base de hidroxipropilmetilcelulose incorporados com cristais e microcristais de curcumina**. 2018. 58 f. TCC – Bacharelado em Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Florianópolis. 2018.

GONZALEZ-ALBADEJO, J., *et al.*, Curcumin and curcuminoids: Chemistry, structural studies and biological properties. **An. Real Acad. Nac. Farm.** v. 81, n 4, p.278-310, 2015.

GUPTA, B. S.; CHEN, B.-R.; LEE, M.-J. Solvation consequences of polymer PVP with biological buffers MES, MOPS, and MOPSO in aqueous solutions. **The journal of chemical thermodynamics**, v. 91, p. 62–72, 2015.

HAHM, E.R. *et al.* New and known symmetrical curcumin derivatives inhibit the formation of Fos-Jun-DNA complex. **Cancer letters**, v. 184, n. 1, p. 89–96, 2002.

HU, L. *et al.* Enhancement of oral bioavailability of curcumin by a novel solid dispersion system. **AAPS PharmSciTech**, v. 16, n. 6, p. 1327–1334, 2015.

IMAMURA, P. M.; BAPTISTELLA, L. H. B. Nitração do fenol, um método em escala semi-micro para disciplina prática de 4 horas. **Química nova**, v. 23, n. 2, p. 270–272, 2000.

KARAVAS, E. *et al.* Effect of hydrogen bonding interactions on the release mechanism of felodipine from nanodispersions with polyvinylpyrrolidone. **European journal of pharmaceuticals and biopharmaceutics: official journal of Arbeitsgemeinschaft für Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V**, v. 63, n. 2, p. 103–114, 2006.

LI, B. *et al.*, Both solubility and chemical stability of curcumin are enhanced by solid dispersion in cellulose derivative matrices. **Carbohydrate polymers**, v. 98, n. 1, p. 1108–1116, 2013.

LIMA, A. DE. **Caracterização química, avaliação da atividade antioxidante in vitro e in vivo, e identificação dos compostos fenólicos presentes no Pequi (Caryocar brasiliense, Camb.)**. [s.l.] Universidade de Sao Paulo, Agencia USP de Gestao da Informacao Academica (AGUIA), 2015.

LIU, J. **Nitrate Esters Chemistry and Technology**. 1. ed. Singapura, Singapore: Springer, 2019. p. 281–340.

NETO, J.J.L. *et al.*, Triplaris gardneriana seeds extract exhibits in vitro anti-inflammatory properties in human neutrophils after oxidative treatment. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 250, n.112474, p. 1-8, 2020.

MANACH, C. *et al.* Polyphenols: food sources and bioavailability. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.79, p.727- 747, 2004.

MARMITT, D.R, *et al.*, Análise da produção científica do Curcuma longa L. (açafraão) em três bases de dados após a criação da RENISUS. **Rev Pan-Amaz Saude [online]**. vol.7, n.1, p.71-77. 2016.

MARTINS, R. M. *et al.* Curcuminoid content and antioxidant activity in spray dried microparticles containing turmeric extract. **Food research international (Ottawa, Ont.)**, v. 50, n. 2, p. 657–663, 2013.

MENG, F. *et al.* (2015). Investigation and correlation of drug polymer miscibility and molecular interactions by various approaches for the preparation of amorphous solid dispersions. **European Journal of Pharmaceutical Sciences: Official Journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences**, v. 71, p.12–24. 2015.

NASCIMENTO, J. C. *et al.*, Determinação da atividade antioxidante pelo método DPPH e doseamento de flavonóides totais em extratos de folhas da Bauhinia variegata L. **Revista Brasileira de Farmácia**, Belo Horizonte, MG, v. 92, n. 4, p. 327- 332, 2011.

OHKAWA, H; OHISHI, N; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Analytical Biochemistry**, v. 95, n. 2, p. 351–358, 1979.

OLIVEIRA, G. L. S. Determinação da capacidade antioxidante de produtos naturais *in vitro* pelo método do DPPH: estudo de revisão. **Rev. Bras. Pl. Med.**, Campinas, v.17, n.1, p.36-44, 2015.

OLIVEIRA, V. B. *et al.* Avaliação do potencial antioxidante frente à oxidação lipídica e da toxicidade preliminar do extrato e frações obtidas das frondes de Dicksonia sellowiana (Presl.) Hook. **Revista brasileira de plantas medicinais**, v. 17, n. 4, p. 614–621, 2015.

PARADKAR, A. *et al.* Characterization of curcumin–PVP solid dispersion obtained by spray drying. **International journal of pharmaceutics**, v. 271, n. 1–2, p. 281–286, 2004.

PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S.; VYVYAN, J. R. **Introdução à Espectroscopia**. 4ª ed. Cengage Learning, 2010.

PENG, Y. *et al.* Anti-inflammatory effects of curcumin in the inflammatory diseases: Status, limitations and countermeasures. **Drug design, development and therapy**, v. 15, p. 4503–4525, 2021.

PIRES, J. *et al.* Ensaio em microplaca de substâncias redutoras pelo método do Folin-Ciocalteu para extratos de algas. **Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo**, São Paulo, p. 1-5, 2017. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/324452676_Ensaio_em_microplaca_de_substancias_redutoras_pelo_metodo_do_Folin-Ciocalteu_para_extratos_de_algas> Acesso em: 1 dez. 2023.

RAVINDRAN, P. N.; SIVARAMAN, K.; BABU, K. N. (EDS.). **Turmeric: The genus Curcuma**. Boca Raton, FL, USA: CRC Press, 2007.

RAWAT, M. *et al.* Nanocarriers: Promising vehicle for bioactive drugs. **Biological & pharmaceutical bulletin**, v. 29, n. 9, p. 1790–1798, set. 2006.

ROCHA, J.F. **Atividades anti-inflamatória *in vitro* e gastroprotetora *in vivo* de sementes de *Licania rígida* benth. (*Chrysobalanaceae*), uma espécie endêmica brasileira**. 2021. 139 f. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciência, Programa de Pós-Graduação em Sistemática, Uso e Conservação da Biodiversidade, Fortaleza, 2021.

SANTOS, P.D.F. **Avaliação da atividade antimicrobiana de microcristais de curcumina**. 2015. 35 f. TCC – Engenharia de Alimentos, Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR). Campo Mourão. 2015.

SANTOS, P.D.F. **Extração de curcuminóides e obtenção *in situ* de nanopartículas**. 2018. 86 f. Dissertação (Pós-Graduação) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR). Programa de Pós-Graduação em Tecnologia em Alimentos. Campo Mourão. 2018

SELVI, N.M.K. Curcumin attenuates oxidative stress and activation of redox-sensitive kinases in high fructose- and high-fat-fed male wistar rats. **Scientia pharmaceutica**, v. 83, n. 1, p. 159–175, 2015.

SEO, S.-W. *et al.* Preparation and pharmacokinetic evaluation of curcumin solid dispersion using Solutol® HS15 as a carrier. **International journal of pharmaceutics**, v. 424, n. 1–2, p. 18–25, 2012.

SHLAR, I. *et al.* The mode of antimicrobial action of curcumin depends on the delivery system: monolithic nanoparticles vs. supramolecular inclusion complex. **RSC advances**, v. 7, n. 67, p. 42559–42569, 2017.

SHPOTYUK, O. *et al.* Positron annihilation lifetime study of polyvinylpyrrolidone for nanoparticle-stabilizing pharmaceuticals. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 117, p. 419–425, 2016.

SILVA, A.C. **Avaliação da atividade antimicrobiana de nanopartículas de curcumina e aplicação de microcristais de curcumina em cenoura minimamente processada**. 2016. 46f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Tecnologia em Alimentos. Campo Mourão. 2016.

SILVA, A. C. DA *et al.* Production and characterization of curcumin microcrystals and evaluation of the antimicrobial and sensory aspects in minimally processed carrots. **Food & function**, v. 8, n. 5, p. 1851–1858, 2017.

SILVA, J.R.D.J. **Avaliação da atividade antioxidante do ácido acetilsalicílico e compostos fenólicos em maçãs, com e sem o uso de biofilme comestível**. 2023 62 f. TCC (Graduação) – Licenciado em Licenciatura em Química, Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR). Campo Mourão. 2023.

SILVA, J.T.D.P. *et al.* Nanoencapsulation of lutein and its effect on mice's declarative memory. **Materials science & engineering. C, Materials for biological applications**, v. 76, p. 1005–1011, 2017.

SILVA, M.R. **Papel do estresse oxidativo no desenvolvimento da fibrose pulmonar: efeitos do tratamento com vitamina C e/ou fotobiomodulação**. 48 f. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Biofotônica Aplicada às Ciências da Saúde) - Universidade São Paulo. Dez. 2018.

SINGH, S.K.; PATRA, A. Evaluation of phenolic composition, antioxidant, anti-inflammatory and anticancer activities of *Polygonatum verticillatum* (L.). **Journal of Integrative Medicine**, v. 16, n. 4, p. 273–282, 2018.

SMITH, M. R. *et al.* Curcumin inhibits fibrosis-related effects in IPF fibroblasts and in mice following bleomycin-induced lung injury. **American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology**, v. 298, n. 5, p. L616–L625, 2010.

SOUSA, C. M. de M. *et al.* Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Quim. Nova**, v. 30, n. 2, p. 351-355, 2007.

SUCUPIRA, N.R. *et al.* Métodos para determinação da atividade antioxidante de frutos. **Journal of Health Sciences**, v. 14, n. 4, 2012. Disponível em: <<https://journalhealthscience.pgsskroton.com.br/article/view/885>> Acesso em: 2 dez. 2023.

YALLAPU, M. M.; JAGGI, M.; CHAUHAN, S. C. Curcumin nanoformulations: a future nanomedicine for cancer. **Drug discovery today**, v. 17, n. 1–2, p. 71–80, 2012.

YANG, H. *et al.* Structure–activity relationship of curcumin: Role of the methoxy group in anti-inflammatory and anticolic effects of curcumin. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 65, n. 22, p. 4509–4515, 2017.

YEN, F.-L. *et al.* Curcumin nanoparticles improve the physicochemical properties of curcumin and effectively enhance its antioxidant and antihepatoma activities. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 58, n. 12, p. 7376–7382, 2010.