



Desenvolvimento de micropartículas bioativas liberadoras de NO e avaliação da biotividade

Development of NO-releasing bioactive microparticles and evaluation of their bioactivity

Maria Vitória Polido de Souza¹, Eduardo Makyama Alves², Regiane da Silva Gonzalez³

RESUMO

Neste estudo, investigamos o papel do estresse oxidativo na regulação da expressão da matriz extracelular em resposta a lesões teciduais, com foco na fibrose pulmonar. O estresse oxidativo resulta da produção excessiva de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, desencadeando danos oxidativos em moléculas biológicas cruciais. Em casos de lesões teciduais persistentes, ocorre um desequilíbrio na expressão da matriz extracelular, levando à fibrose e perda da função do órgão. Para combater esse processo, nossa pesquisa avaliou a capacidade antioxidante da curcumina e do nitrato de curcumina. Os resultados revelaram que o nitrato de curcumina demonstrou maior eficácia na redução do radical DPPH e na inibição da peroxidação lipídica em concentrações mais baixas, devido à capacidade de liberar óxido nítrico. No entanto, em concentrações mais altas, a curcumina padrão e o nitrato de curcumina apresentaram resultados equivalentes. Esse estudo contribui para a compreensão das respostas antioxidantes em contextos de estresse oxidativo. As descobertas podem ter implicações na busca por terapias que visam restabelecer o equilíbrio entre antioxidantes e oxidantes para o tratamento da fibrose pulmonar. **PALAVRAS-CHAVE:** Curcumina; estresse oxidativo; fibrose pulmonar; nitrato de curcumina.

ABSTRACT

In this study, we investigated the role of oxidative stress in regulating extracellular matrix expression in response to tissue injury, with a focus on pulmonary fibrosis. Oxidative stress results from the excessive production of reactive oxygen and nitrogen species, triggering oxidative damage to crucial biological molecules. In cases of persistent tissue damage, there is an imbalance in the expression of the extracellular matrix, leading to fibrosis and loss of organ function. To combat this process, our research evaluated the antioxidant capacity of curcumin and curcumin nitrate. The results showed that curcumin nitrate was more effective at reducing the DPPH radical and inhibiting lipid peroxidation at lower concentrations, due to its ability to release nitric oxide. However, at higher concentrations, standard curcumin and curcumin nitrate showed equivalent results. This study contributes to the understanding of antioxidant responses in contexts of oxidative stress. The findings may have implications for the search for therapies aimed at restoring the balance between antioxidants and oxidants for the treatment of pulmonary fibrosis. **KEYWORDS:** Curcumin; oxidative stress; pulmonary fibrosis; curcumin nitrate.

INTRODUÇÃO

¹ Bolsista do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campo Mourão, Paraná, Brasil. E-mail: mariavitoriapsmv@gmail.com. ID Lattes: 4315706118041757.

² Bolsista da Fundação Araucária. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campo Mourão, Paraná, Brasil. E-mail: eduardomakyama@alunos.utfpr.edu.br. ID Lattes: 0611617043189588.

³ Docente no Departamento de Química. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campo Mourão, Paraná, Brasil. E-mail: regiane@utfpr.edu.br. ID Lattes: 7581675568754949.

**XIII Seminário de Extensão e
Inovação
XXVIII Seminário de Iniciação Científica e Tecnológica da
UTFPR**



SEI-SICITE
2023

Ciência e Tecnologia na era da Inteligência Artificial: Desdobramentos no Ensino Pesquisa e Extensão

20 a 23 de novembro de 2023 - Campus Ponta Grossa, PR



O estresse oxidativo se caracteriza pela produção excessiva de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, sobrecarregando os mecanismos de defesa antioxidante, tanto os não enzimáticos (como o ácido ascórbico e o ácido úrico) quanto os enzimáticos (como a catalase, superóxido dismutase e glutathione redutase). Isso resulta na ocorrência de estresse oxidativo e no surgimento de diversas doenças devido aos danos oxidativos causados a moléculas biológicas cruciais, como proteínas e DNA (SILVA, 2018).

Quando há lesão nos tecidos, ocorre uma resposta inflamatória, desencadeando estresse oxidativo e regulação da degradação e expressão da matriz extracelular como parte do processo de reparo da lesão (SILVA, 2018). Geralmente, uma vez que a lesão é tratada, a expressão da matriz extracelular é inibida e o tecido é capaz de restaurar sua homeostase, resultando em um processo de reparo adaptativo (SILVA, 2018). Entretanto, em situações onde a lesão é mais severa e persiste no tecido, pode ocorrer uma perda de controle na expressão da matriz extracelular, levando ao aumento do tecido fibrótico e à perda da função do órgão (SILVA, 2018).

Nesse contexto, o estresse oxidativo desempenha um papel crucial na promoção do reparo inadequado, pois as reações redox estimulam a expressão da matriz extracelular. Portanto, pesquisas nesta área buscam restabelecer o equilíbrio entre antioxidantes e oxidantes para o tratamento da fibrose pulmonar (SILVA, 2018).

METODOLOGIA

AVALIAÇÃO DO PERCENTUAL DE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE (AA %)

O procedimento em questão foi executado conforme as diretrizes de Nascimento et al. (2011), com certas modificações incorporadas. Para tal finalidade, adicionou-se 0,1 mL da solução a 3 mL de uma solução de DPPH com uma concentração de 0,003% (m/v). A mistura foi deixada em repouso no escuro por um período de 30 minutos e, posteriormente, submetida à avaliação espectrofotométrica a 515 nm. A finalidade subjacente à capacidade de eliminação do radical DPPH é determinar a percentagem de atividade antioxidante (AA %).

AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE INIBIÇÃO DA PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA

O procedimento foi ajustado com base na abordagem metodológica apresentada por Rocha (2021), tomando como referência o trabalho de Ohkawa, Ohishi e Yagi (1979). Essencialmente, o método envolve a análise espectrofotométrica da habilidade de inibição da peroxidação lipídica em uma solução de fosfolípido derivado da gema do ovo.

Para realizar isso, o primeiro passo envolveu a extração do fosfolípido da gema do ovo. Isso foi conseguido utilizando uma combinação de hexano e álcool isopropílico na proporção de 3:2. O extrato resultante passou por uma filtração usando algodão como meio filtrante. O líquido filtrado foi então colocado em uma placa de Petri e deixado para secar durante 24 horas, em um ambiente escuro e em uma capela de exaustão.

O material remanescente na placa foi solubilizado em água destilada (1% m/v), resultando em uma mistura homogênea. Esta mistura foi conservada em condições protegidas da luz, a fim de evitar desnaturação da gema.

XIII Seminário de Extensão e Inovação
XXVIII Seminário de Iniciação Científica e Tecnológica da UTFPR



SEI-SICITE
2023

Ciência e Tecnologia na era da Inteligência Artificial: Desdobramentos no Ensino Pesquisa e Extensão

20 a 23 de novembro de 2023 - Campus Ponta Grossa, PR



Para investigar a capacidade de inibição da peroxidação lipídica do nitrato de curcumina, três concentrações distintas da amostra foram submetidas à análise. Essas concentrações e seus detalhes podem ser encontrados no Quadro 1:

Quadro 1 – Diferentes concentrações feitas para cada tipo de curcumina

	Análises	H2O (uL)	Homogenato (uL)	FeSO4/)x mol/L) (uL)	Amostra (uL)
Curcumina Padrão	Concentração 1 (5mg/mL)	120	80	10	200
	Concentração 2 (1,05mg/mL)	220	80	10	100
	Concentração 3 (0,22mg/mL)	270	80	10	50
Nitro Curcumina	Concentração 1 (5mg/mL)	120	80	10	200
	Concentração 2 (1,05mg/mL)	220	80	10	100
	Concentração 3 (0,22mg/mL)	270	80	10	50
Controles	Negativo 1	330	80	-	-
	Negativo 2	130	80	-	200
	Positivo	320	80	10	-

Fonte: Elaborado pelos autores (2023).

Todas as combinações foram preparadas em triplicata e, subsequentemente, incubadas com a homogeneização da membrana de ovo a uma temperatura de 37°C por uma duração de uma hora. Após essa fase de incubação, 400 µL de ácido acético (20% com pH 3) e 400 µL de uma solução aquosa de ácido tiobarbitúrico (TBA, 0,6% m/v) foram adicionados a todos os tubos. Esses tubos foram novamente colocados em banho-maria a 95°C por uma hora. No passo final, após a segunda incubação, 400 µL de butanol foram introduzidos em todas as amostras, as quais foram subsequentemente submetidas a uma centrifugação a 2000 rpm por 2 minutos. Logo após, as amostras foram avaliadas espectrofotometricamente a 532 nm.

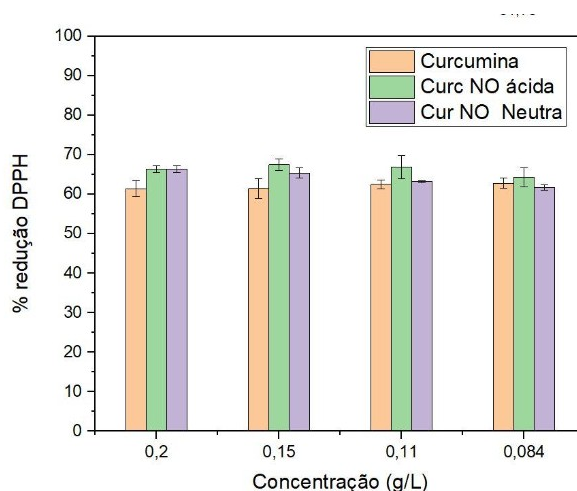


RESULTADOS E DISCUSSÕES

AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (ROS)

O resultado dos cálculos e a avaliação da reação entre o DPPH e as curcuminas encapsuladas (tanto a nitrada quanto a padrão) pode ser observado na Figura 1:

Figura 1 – Gráfico da porcentagem de redução de DPPH das análises



Fonte: Autoria Própria.

Foi observado que na concentração mais baixa empregada (0,0084 g/L), houve uma semelhança notável no desempenho. No entanto, nas outras três concentrações, o nitrato de curcumina apresentou uma maior eficácia na redução do DPPH. Uma possível explicação para esse resultado está relacionada ao comportamento do óxido nítrico presente no nitrato de curcumina. O comportamento desse óxido nítrico é ambivalente, o que significa que ele pode tanto beneficiar a reação e amplificar os resultados de redução do DPPH, quanto ter o efeito oposto.

AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE INIBIÇÃO DA PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA

O resultado obtido deste procedimento pode ser observado na imagem a seguir (Figura 2):

Figura 2 – Gráfico da inibição da peroxidação lipídica

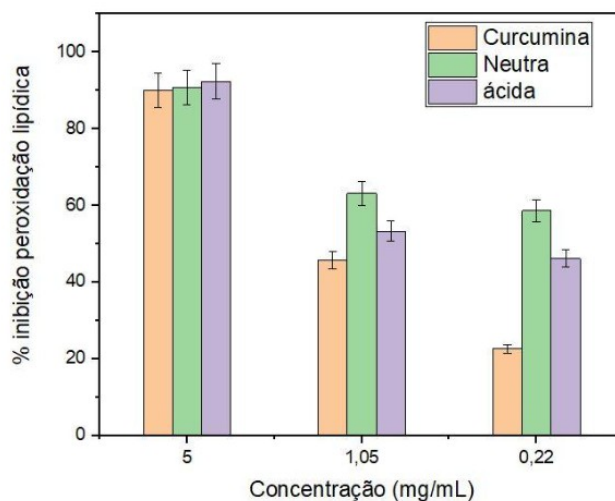
**XIII Seminário de Extensão e
Inovação
XXVIII Seminário de Iniciação Científica e Tecnológica da
UTFPR**



SEI-SICITE
2023

Ciência e Tecnologia na era da Inteligência Artificial: Desdobramentos no Ensino Pesquisa e
Extensão

20 a 23 de novembro de 2023 - Campus Ponta Grossa, PR



Fonte: Autoria Própria.

Temos a curcumina padrão, representada pela coloração alaranjada (Curcumina), o nitrato de curcumina exibindo uma coloração esverdeada (Neutra) e a curcumina que passou pelo processo de nitratação, porém não foi neutralizada, apresentando uma tonalidade azulada (ácida).

Ao analisar as diversas concentrações, é evidente que o nitrato de curcumina apresentou uma porcentagem superior na inibição da peroxidação lipídica. No entanto, ao considerar o desvio padrão, percebe-se que o desempenho da curcumina padrão (Curcumina) e do nitrato de curcumina (Verde) são praticamente equivalentes.

Quando comparados em menor concentração verifica-se que a curcumina nitrada apresenta melhor resultado de inibição da peroxidação lipídica. Este resultado pode ser associado ao fato da curcumina nitrada apresentar a capacidade de liberar óxido nítrico (NO), uma molécula com potente e comprovada ação antioxidante, quando empregada em pequenas concentrações (Mazo, 2011). Com o aumento da concentração a ação antioxidante do NO não se sobressai a atividade da própria curcumina, e portanto apresentam atividades equivalentes.

CONCLUSÕES

Torna-se possível compreender as nuances de como a curcumina padrão e o nitrato de curcumina reagem em diferentes concentrações e contextos frente ao estresse oxidativo.



Agradecimentos

Gostaria de expressar minha sincera gratidão à UTFPR, a instituição que me proporcionou a valiosa oportunidade de realizar uma Iniciação Científica, enriquecendo significativamente meus conhecimentos e experiência acadêmica. Agradeço também ao CNPq pelo apoio financeiro e recursos que tornaram possível a realização desse projeto. Minha mais profunda gratidão vai para minha orientadora, Regiane Gonzalez, cuja orientação, apoio e expertise foram fundamentais para o sucesso deste trabalho. Seu comprometimento e dedicação foram inspiradores, e estou imensamente grata por sua orientação ao longo dessa jornada de pesquisa.

Conflito de Interesse

Não há conflito de interesse.

REFERÊNCIAS

MAZO, DANIEL FERRAZ DE CAMPOS. Anti-fibrogenic effect of the nitric oxide donor S-nitroso-Nacetylcysteine (SNAC) in experimental non-alcoholic steatohepatitis. Faculdade de Medicina. São Paulo, 2011.

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.

ROCHA, J. DE F. Atividades anti-inflamatória in vitro e gastroprotetora in vivo da semente de Licania rigida Benth. (Chrysobalanaceae), uma espécie endêmica brasileira. 2021.

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. Dezembro de 2018.