



**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
MESTRADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

MARIA VITÓRIA MINZONI DE SOUZA IACIA

**USO DE NANOEMULSÃO DE CURCUMINA EM MODELO ANIMAL
DE DANO INTESTINAL INDUZIDO POR INDOMETACINA**

Presidente Prudente - SP

2023

MARIA VITÓRIA MINZONI DE SOUZA IACIA

**USO DE NANOEMULSÃO DE CURCUMINA EM MODELO ANIMAL
DE DANO INTESTINAL INDUZIDO POR INDOMETACINA**

Dissertação apresentada à Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade do Oeste Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre - Área de concentração: Ciências da Saúde.

Orientadora:
Prof^a. Dr^a. Lizziane Kretli Winkelströter Eller

Catálogo Internacional na Publicação (CIP)

636.089
I11u

lacia, Maria Vitória Minzoni de Souza
Uso de nanoemulsão de curcumina em modelo animal de dano intestinal induzido por indometacina \ Maria Vitória Minzoni de Souza lacia; orientadora Lizziane Kretli Winkelströter Eller. -- Presidente Prudente, 2023.
39 f.: il.

Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) -
Universidade do Oeste Paulista – Unoeste, Presidente
Prudente, SP, 2023.
Bibliografia.

1. Curcumina. 2. Indometacina. 3. Compostos
Fitoquímicos. I. Eller, Lizziane Kretli Winkelströter, orient. II.
Título.

Bibliotecária: Jakeline Margaret de Queiroz Ortega – CRB 8/6246

MARIA VITÓRIA MINZONI DE SOUZA IACIA

**USO DE NANOEMULSÃO DE CURCUMINA EM MODELO ANIMAL
DE DANO INTESTINAL INDUZIDO POR INDOMETACINA**

Dissertação apresentada à Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade do Oeste Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre - Área de concentração: Ciências da Saúde.

Presidente Prudente, 23 de junho de 2023.

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Profa. Dra. Lizziane Kretli Winkelströter Eller
Universidade do Oeste Paulista – Unoeste
Presidente Prudente - SP

Prof. Dr. Leonardo de Oliveira Mendes
Universidade do Oeste Paulista – Unoeste
Presidente Prudente - SP

Prof. Dr. Fabrício Luiz Tulini
Universidade Federal do Oeste da Bahia – UFOB
Barreiras - BA

Às mulheres da minha vida, Katia Aparecida de Souza, Solange Maria Minzoni e Priscila de Souza Norberto.

Dedico

AGRADECIMENTOS

À Deus, por me dar forças, me iluminar e me guiar durante esse percurso e por permitir que eu chegasse até aqui.

À Prof. Lizziane, pela orientação, compreensão, ajuda, paciência, amizade e exemplo profissional. Obrigada pelo tempo disponibilizado a este trabalho e por ter me ensinado tudo que estava ao seu alcance.

À minha mãe, Katia, por ter me ensinado valores e princípios que só o amor pode fazer, você é essencial na minha vida.

Ao meu namorado Giovanni, por todo o apoio e momentos que estive comigo quando quis chorar.

Às minhas parceiras de laboratório Karolinny e Meire, pela amizade, companheirismo e momentos de alegria. Vocês ficarão eternizadas em meu coração.

Às técnicas de laboratório de microbiologia Maria e Adriane, a ajuda e amizade de vocês foi de extrema importância.

Aos alunos de Iniciação Científica, Thiago, Maria Eduarda, Kimberlly, William pela parceria, sem vocês muitos resultados não teriam sido obtidos.

“O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – (Brasil) CAPES – Código de Financiamento 001”.

*“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor,
mas lutei para que o melhor fosse feito.
Nao sou o que deveria ser, mas Graças a
Deus não sou o que era antes.”
(Marthin Luther King)*

*“Foi o tempo que dedicastes à tua rosa
que a fez tão importante.”
(Trecho de O pequeno Príncipe)*

RESUMO

Uso de nanoemulsão de curcumina em modelo animal de dano intestinal induzido por indometacina

A micronização surge como estratégia para melhorar propriedades físicas e consequentemente absorção de produtos naturais com potencial benéfico a saúde, como a curcumina. Diante do exposto, este estudo avaliou o efeito anti-inflamatório e de modulação intestinal de nanoemulsão carreadora de curcumina em modelo animal de indução de dano intestinal por indometacina. Nanoemulsões contendo curcumina foram preparadas pelo método de emulsificação espontânea com óleo de mamona, lecitina de soja e curcumina em etanol ($\geq 99,8\%$, grau HPLC). A nanoemulsão foi então caracterizada por espalhamento dinâmico da luz (DLS) e potencial zeta e a morfologia avaliada por microscopia eletrônica de varredura (MEV). Foi testada sua estabilidade em diferentes condições de pH (2,0; 7,0 e 8,0) e temperatura de armazenamento (8, 30 e 37°C) nos momentos 0, 7, 14, 21 e 28 dias. Na experimentação animal foram utilizados 36 camundongos machos linhagem *Mus musculus* (C57BL/6). Os animais foram divididos aleatoriamente em 4 grupos de 9 camundongos para uma etapa de adaptação por 7 dias, pré-indução por 10 dias, seguidos de indução de dano intestinal + tratamento por 4 dias. Seu impacto na inflamação intestinal foi avaliado a partir de análise macroscópica, histopatológica e metagenômica. Os resultados foram compilados em gráficos e tabelas; a análise estatística foi realizada considerando nível de significância de 0,05. No presente estudo, foi obtida uma nanoemulsão estável com tamanho 409,8 nm, PDI de 0,132 e potencial zeta de -18,8 mV, entretanto, estas perderam carga em pH 2, mostrando instabilidade em meios ácidos ($p < 0,05$). Na experimentação animal foi demonstrado que a curcumina reduziu 50% da inflamação e 100% da hiperplasia linfóide ($p < 0,05$). A nanoemulsão não apresentou melhora significativa na inflamação intestinal induzida por indometacina. A análise metagenômica demonstrou que a indometacina reduziu a frequência relativa do filo *Firmicutes* ($p < 0,05$). O grupo tratado com nanoemulsão de curcumina apresentou maior abundância relativa do gênero *Lactobacillus* ($p < 0,05$). Como conclusão, confirmou-se a eficácia da curcumina em reduzir a inflamação intestinal. Apesar da nanoemulsão de curcumina não apresentar efeito funcional no dano intestinal ela foi relevante na modulação da microbiota intestinal. Desta forma, são necessários novos estudos para aprimorar a formulação da nanoemulsão e viabilizar sua futura aplicação no tratamento de doença inflamatória intestinal.

Palavras chave: bioativos, histopatologia, metagenômica

ABSTRACT

Curcumin nanoemulsion use in animal model of intestinal damage induced by indomethacin

Micronization emerges as a strategy to improve physical properties and consequently the absorption of natural products with potential health benefits, such as curcumin. Given this context, this study evaluated the anti-inflammatory and intestinal modulation effects of a curcumin-loaded nanoemulsion in an animal model of indomethacin-induced intestinal damage. Nanoemulsions containing curcumin were prepared by the spontaneous emulsification method with castor oil, soybean lecithin, and curcumin in ethanol ($\geq 99.8\%$, HPLC grade). The nanoemulsion was then characterized by dynamic light scattering (DLS) and zeta potential, and its morphology was evaluated by scanning electron microscopy (SEM). Its stability was tested under different pH conditions (2.0, 7.0, and 8.0) and storage temperatures (8, 30, and 37°C) at time points of 0, 7, 14, 21, and 28 days. For the animal experiments, 36 male *Mus musculus* mice (C57BL/6) were used. The animals were randomly divided into 4 groups of 9 mice for an adaptation phase of 7 days, pre-induction for 10 days, followed by intestinal damage induction + treatment for 4 days. Its impact on intestinal inflammation was assessed through macroscopic, histopathological, and metagenomic analyses. The results were compiled into graphs and tables; statistical analysis was performed considering a significance level of 0.05. In the present study, a stable nanoemulsion with a size of 409.8 nm, PDI of 0.132, and zeta potential of -18.8 mV was obtained. However, the emulsions lost charge in pH 2, showing instability in acidic environments ($p < 0.05$). In the animal experiment, it was demonstrated that curcumin reduced inflammation by 50% and lymphoid hyperplasia by 100% ($p < 0.05$). The nanoemulsion did not show a significant improvement in indomethacin-induced intestinal inflammation. Metagenomic analysis showed that indomethacin reduced the relative frequency of the *Firmicutes* phylum ($p < 0.05$). The group treated with curcumin nanoemulsion showed a higher relative abundance of the *Lactobacillus* genus ($p < 0.05$). In conclusion, the efficacy of curcumin in reducing intestinal inflammation was confirmed. Although the curcumin nanoemulsion did not show a functional effect on intestinal damage, it was relevant in modulating the intestinal microbiota. Therefore, further studies are needed to improve the nanoemulsion formulation and enable its future application in the treatment of inflammatory bowel disease.

Keywords: Bioactives; Histopathology; Metagenomics.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Delineamento experimental para avaliação da indução de dano intestinal por indometacina durante a fase de adaptação, pré-indução, indução+tratamento e eutanásia. Considerar CMC: carboximetilcelulose, Ind: Indometacina e NC: nanoemulsão de curcumina.....	17
Figura 2 -	Imagem de microscopia eletrônica de varredura (MEV) com a estrutura, topologia de superfície e tamanho da nanoemulsão de curcumina criofixada em nitrogênio líquido e sedimentada em papel filtro.....	20
Figura 3 -	Resultados do potencial Zeta da nanoemulsão quando incubadas a diferentes temperaturas (5, 25 e 37°C) durante 0, 7, 14, 21 e 28 dias de incubação sendo considerado A) pH 2,0 B) pH7,0 e C) pH 8,0.....	21
Figura 4 -	Avaliação macroscópica e microscópica do intestino delgado de camundongos em experimentação in vivo para avaliação da indução de dano intestinal sob os seguintes tratamentos: C (carboximetilcelulose 0,5%- controle) I- indometacina 10mg/kg IC - indometacina 10mg/kg + curcumina 100mg/kg IN- indometacina 10mg/kg + nanoemulsão de curcumina 100mg/kg. Considerar em A) Avaliação macroscópica do comprimento do intestino delgado B) Parâmetros microscópicos avaliados em porcentagens dos escores de inflamação C) Coloração hematoxilina-eosina intestino delgado sendo observado (a) mucosa normal intestino delgado grupo CMC– 200x; (b) seta aponta hiperplasia linfoide em intestino delgado em grupo I – 100x; (c) seta indica inflamação leve do intestino delgado em grupo IC – 200x; (d) seta aponta hiperplasia linfoide em intestino delgado em grupo IN – 200x.....	23
Figura 5 -	Avaliação microscópica do intestino grosso de camundongos em experimentação in vivo para avaliação da indução de dano intestinal sob os seguintes tratamentos: C (carboximetilcelulose 0,5%- controle) I- indometacina 10mg/kg IC - indometacina 10mg/kg + curcumina 100mg/kg IN- indometacina 10mg/kg + nanoemulsão de curcumina 100mg/kg . Considerar em A) Parâmetros microscópicos avaliados em porcentagens dos escores de inflamação B) Coloração hematoxilina-eosina intestino grosso sendo observado em: (a) mucosa normal intestino grosso em grupo CMC –200x; (b) inflamação do intestino grosso, seta aponta infiltrado linfocitário em grupo I – 200x; (c) inflamação leve do intestino grosso no grupo IC– 200x; (g) inflamação moderada do intestino grosso, setas apontam infiltrados linfocitários – 200x.....	24
Figura 6 -	Avaliação da abundância relativa da microbiota intestinal obtida a partir da análise de fezes de camundongos submetidos a indução de dano intestinal sob as seguintes condições: C (carboximetilcelulose 0,5%- controle) I- indometacina 10mg/kg IC - indometacina 10mg/kg + curcumina 100mg/kg IN- indometacina 10mg/kg + nanoemulsão de curcumina 100mg/kg . Considerar em A) análise referente a diversidade dos Filos dos microrganismos B) análise referente a diversidade dos Gêneros dos microrganismos C) análise referente a diversidade das vias metabólicas utilizadas pelos microrganismos.....	26

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Parâmetros microscópicos avaliados e seus respectivos escores.....	18
------------	--	----

SUMÁRIO

1	Introdução	14
2	Materiais e métodos.....	15
2.1	Preparo de nanoemulsão.....	15
2.2	Avaliação da nanoemulsão contendo curcumina no dano intestinal induzido por idometacina	16
2.2.1	Experimentação animal	16
2.2.2	Análise histopatológica	17
2.2.3	Análise metagenômica da microbiota intestinal.....	19
2.3	Análise estatística.....	19
3	Resultados	20
4	Discussão	29
5	Conclusão	31
	REFERÊNCIAS	32