



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÀ
CENTRO DE CIÊNCIAS SAÚDE
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA**

NAYANA FREIRE DE ALMEIDA FONTES

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL BIOLÓGICO DO EXTRATO DA ALGA E DAS
NANOPARTÍCULAS DE OURO BIOSINTETIZADO COM O EXTRATO DA ALGA
CYSTOSEIRA TAMARISCIFOLIA EM MODELO EXPERIMENTAL DE DOENÇA
DE CROHN**

FORTALEZA- CE

2023

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL BIOLÓGICO DO EXTRATO DA ALGA E DAS
NANOPARTÍCULAS DE OURO BIOSINTETIZADO COM O EXTRATO DA ALGA
CYSTOSEIRA TAMARISCIFOLIA EM MODELO EXPERIMENTAL DE DOENÇA
DE CROHN**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências Morfofuncionais.

Orientadora: Profa. Dra. Antoniella Souza Gomes Duarte

Coorientadora: Profa. Dra. Andréia Ferreira de Castro Gomes.

FORTALEZA

2023

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- F767a Fontes, Nayana Freire de Almeida.
AVALIAÇÃO DO POTENCIAL BIOLÓGICO DO EXTRATO DA ALGA E DAS
NANOPARTÍCULAS DE OURO BIOSINTETIZADO COM O EXTRATO DA ALGA
CYSTOSEIRA TAMARISCIFOLIA EM MODELO EXPERIMENTAL DE DOENÇA DE CROHN
/ Nayana Freire de Almeida Fontes. – 2023.
121 f. : il. color.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa
de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais, Fortaleza, 2023.

Orientação: Profa. Dra. Antoniella Souza Gomes Duarte.

Coorientação: Profa. Dra. Andréia Ferreira de Castro Gomes.

1. Doença de Crohn. 2. Alga *Cystoseira tamariscifolia*. 3. Nanopartículas de Ouro.. I.
Título.

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL BIOLÓGICO DO EXTRATO DA ALGA E DAS
NANOPARTÍCULAS DE OURO BIOSINTETIZADO COM O EXTRATO DA ALGA
CYSTOSEIRA TAMARISCIFOLIA EM MODELO EXPERIMENTAL DE DOENÇA
DE CROHN**

Aprovada em: ____/____/____.

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências Morfofuncionais.
Orientadora: Profa. Dra. Antoniella Souza Gomes Duarte
Coorientadora: Profa. Dra. Andréia Ferreira de Castro Gomes.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Antoniella Souza Gomes Duarte (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dra. Andréia Ferreira de Castro Gomes (Coorientador)
Universidade do Minho (UMINHO)

Dra. Maria Luana Gaudencio dos Santos Moraes
Centro Universitário Estácio do Ceará (Estácio-Idomed)

Dra. Theídes Batista Crneiro
Universidade Federal do Piauí (UFPI)

Dra. Danielle Abreu Foschetti
Universidade Federal do Ceará (UFC)

AGRADECIMENTOS

À Profa. **Dra. Antoniella Souza Gomes**, amiga, professora e orientadora em uma só pessoa. Me ensinou a “caminhar” e conseqüentemente me apaixonar pelo universo da pesquisa. Gratidão por cada segundo vivido com ela, sempre cheios de alegrias, desafios e sobretudo de aprendizado.

À Profa. **Dra. Andréia Ferreira de Castro Gomes**, ser humano ímpar, de fácil convívio, acessível, de tranquilidade transmissível e docente com expertise ao que se propõe. Aceitou meu convite para ser minha coorientadora com muito carinho e se tornou uma amiga a qual tenho grande admiração e apreço. Agradeço imensamente a orientação a mim dedicada.

À Profa **Dra. Gerly Anne de Castro Brito**, a primeira idealizadora de todo esse caminho, até aqui percorrido. Me acolheu, de forma maternal no Núcleo de Estudos em Microscopia e Processamento de Imagens- NEMPI, professora ao qual deve-se seguir como exemplo diferenciado e promissor.

A **Inácio Manuel de Lima Ferreira**, pessoa em que reconheço a importância chave na realização desse projeto em todos os âmbitos. Homem que vê o próximo sem distinções, de tamanha sensibilidade e humildade, peculiarmente natural, merecedor da minha admiração, respeito e carinho.

A **Sandro Max Pinto Machado**, meu muito obrigada pelo suporte e presença nos procedimentos inerentes ao estudo, por sua disponibilidade e gentileza, que interferiram diretamente nos resultados alcançados.

Aos **mestres**, agradeço a oportunidade da inserção científica. Já que o docente não se restringe somente a temática da tese, mas acima de tudo em ofertar, de forma genuína o conhecimento adquirido ao longo de sua vida acadêmica, dedicada ao saber científico, nas demasiadas buscas por conhecimento e desenvolvimento e em parcerias profissionais; sendo refletido no compromisso em orientar com maestria seus alunos.

Aos amigos de convivência e comunicação diária, **Ageu, Jailton, Camila, Elisangêla e Eirtônio Jr**, vocês possuem importância expressiva laborativa e pessoal, cada um à sua maneira e de forma única. Agradeço a todos pelos anos de amizade a mim desprendida, os momentos de lazer, as lágrimas, os sorrisos, o acolhimento e a cumplicidade; essa experiência jamais teria toda essa relevância sem a amizade de vocês, os tenho com eterna gratidão e apreço.

Aos **técnicos** do laboratório do NEMPI, **Júnior e Flávia**, exímios profissionais, sempre organizados e pontuais, contribuindo de forma exemplar a pesquisa. A **Laísa (Lala)**, sempre disponível e resolutiva nas burocracias inerentes, e por sua delicadeza e paciência.

Aos que não foram mencionados aqui, reconheço a importância da participação de forma direta ou indireta e aos que se identificam com a pesquisa e aos que facilitam seu entendimento e o torna acessível, meus agradecimentos.

A fonte fomentadora **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)**.

A Universidade Federal do Ceará-UFC-Ce.

Ao **Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais- (PCMF)** da Universidade Federal do Ceará- UFC.

Ao **Departamento de Biologia da Universidade do Minho- UMINHO** por intermédio da Profa **Dra. Andréia Ferreira de Castro Gomes**, que viabilizou esse estudo.

À **Minha Família**, que é de suma importância, por saber que sempre me apoiarão e estarão comigo incondicionalmente, independente de quaisquer que sejam as situações, é pertencimento divino, é direcionamento de onde vim e para onde posso regressar, sempre!

A **Deus**, base de sustentação de tudo que pude ter de abstrato, palpável e imensurável nesse e em tantos outros percursos, aquele que me constitui, dia após dia. Por me consentir o dom da vida e me redirecionar ao seu encontro quantas vezes forem necessárias.

RESUMO

A doença inflamatória intestinal apresenta como principais categorias a Doença de Crohn e a colite ulcerativa e representa um grupo de afecções intestinais inflamatórias crônicas idiopáticas. A remissão da doença é de alcance complexo e difícil, mesmo com tratamentos farmacológicos e estratégia terapêutica preconizados. Na literatura encontra-se publicações com estudos relacionados ao uso da alga *Cystoseira tamariscifolia* e a eficácia de suas atividades farmacológicas, dentre elas: neuroprotetora, bactericida, gastroprotetora e anti-inflamatória. Os nanocarreadores, como por exemplo as nanopartículas de ouro, apresentam outros parâmetros importantes, como por exemplo: bom direcionamento para o local alvo, toxicidade reduzida e alto tempo de circulação. Diante do exposto, o objetivo desse estudo foi investigar o efeito anti-inflamatório e antioxidante da alga *Cystoseira tamariscifolia* (CT) e do uso da alga (CT) com nanopartículas de ouro (Au@CT) em modelo experimental de Doença de Crohn. Utilizou-se 75 camundongos Swiss machos (*Mus musculus*) com massa corpórea entre 25 g e 30g. Para o modelo experimental, o ácido acético 8% (AA) foi diluído em água destilada (100ml), sendo esta solução administrada via retal, num volume de 0,2ml por 10 gramas de peso animal. Os animais foram divididos em 8 grupos experimentais (09 animais/grupo): grupo salina, grupo colite, grupo dexametasona (0,2 ml/30g), grupo CT (doses: 25, 50 e 100 mg/Kg), grupo Au@CT (doses: 25, 50 e 100 mg/Kg). Após 12 horas da indução da colite e os tratamentos, os animais foram eutanasiados e uma extensão de 5 cm do cólon coletados para análises morfométricas, histológicas e bioquímicas através dos escores macroscópicos e microscópicos, imuno-histoquímica para S100 beta e GFAP. Parâmetros bioquímicos: mieloperoxidase (MPO), dosagem de citocinas IL-1beta e TNF-alfa; parâmetros bioquímicos: determinação da glutathiona reduzida (GSH), atividade de malondialdeído (MDA) e mieloperoxidase (MPO). Os dados paramétricos foram analisados por teste de variância (ANOVA) seguido pelo teste de Bonferroni e para os escores macroscópicos e histológicos, o teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn. Verificou-se que há atividade antioxidante e anti-inflamatória expressiva no extrato de alga CT, assim como a Au@CT e que ele não apresenta toxicidade para proliferação celular *in vitro* (GONÇALVES, A. et al., 2023). O pré-tratamento, com Dexametasona ou Au@CT, nas doses de 25 e 50 mg/kg, foram capazes de prevenir os aspectos inflamatórios como: úlcera, hiperemia, edema e prolapso do cólon, quando comparado ao grupo Colite. O grupo CT 50mg/kg e Au@CT 50mg/kg apresentaram redução significativa dos escores macroscópicos, bem como nos escores microscópicos, quando comparado com o grupo colite. Para glutathiona reduzida, a alga CT 50mg/kg e Au@CT 50mg/kg preveniram o consumo de GSH e reduziu do estresse oxidativo, comprovado pela diminuição na concentração MDA quando comparado com o grupo Colite. A atividade de MPO apresentou redução significativa ao grupo tratado com CT 50mg/kg e Au@CT 50mg/kg. O pré-tratamento, com Dexametasona ou CT 50mg/kg ou Au@CT, nas doses de 25 e 50 mg/kg, foram capazes de diminuir os níveis de citocinas IL1-beta e TNF alfa, assim como preservaram as células gliais do plexo mioentérico. Concluímos que a alga *Cystoseira tamariscifolia* (CT) e nanopartículas de ouro biossintetizado com o extrato da alga *Cystoseira tamariscifolia* Au@CT possuem um potente potencial biológico capaz de reverter os processos inflamatórios, oxidantes e exercer neuroproteção na Doença de Crohn, em modelo experimental induzido por ácido acético.

Palavras-chave: Doença de Crohn, Alga *Cystoseira tamariscifolia*, Nanopartículas de Ouro.

ABSTRACT

Inflammatory bowel disease has Crohn's disease and ulcerative colitis as main categories and represents a group of idiopathic chronic inflammatory bowel diseases. Remission of the disease is complex and difficult to achieve, even with pharmacological treatments and recommended therapeutic strategy. In the literature, one can find publications with studies related to the use of the alga *Cystoseira tamariscifolia* and the effectiveness of its pharmacological activities, among them: neuroprotective, bactericidal, gastroprotective and anti-inflammatory. Nanocarriers, such as Gold nanoparticles, have other important parameters, such as: good direction to the local target, reduced emission and high circulation time. Given the above, the aim of this study was to investigate the anti-inflammatory and antioxidant effect of the algae *Cystoseira tamariscifolia* (CT) and the use of the algae (CT) with gold nanoparticles (Au@CT) in an experimental model of Crohn's disease. 75 male Swiss mice (*Mus musculus*) with body mass between 25 g and 30 g were used. For the experimental model, 8% acetic acid (AA) was diluted in distilled water (100ml), and this solution was administered rectally, in a volume of 0.2ml per 10 grams of animal weight. The animals were divided into 8 experimental groups (09 animals/group): saline group, colitis group, dexamethasone group (0.2 ml/30g), CT group (doses: 25, 50 and 100 mg/Kg), Au@CT group (doses: 25, 50 and 100 mg/Kg). After 12 hours of colitis induction and treatments, the animals were euthanized and a 5 cm extension of the colon for morphometric, histological, and biochemical analyzes through macroscopic and microscopic scores, immunohistochemistry for S100 beta and GFAP. Biochemical parameters: myeloperoxidase (MPO), dosage of IL-1beta and TNF-alpha cytokines; biochemical parameters: determination of reduced glutathione (GSH), malondialdehyde (MDA) and myeloperoxidase (MPO) activity. Parametric data were analyzed by the test of variance (ANOVA) applied by the Bonferroni test and for the macroscopic and histological scores, the Kruskal-Wallis test applied by the Dunn test. It was verified that there is expressive antioxidant and anti-inflammatory activity in the CT seaweed extract, as well as Au@CT and that it does not present toxicity to cell cells in vitro (GONÇALVES, A; et al. 2023). Pre-treatment, with Dexamethasone or Au@CT, at doses of 25 and 50 mg/kg, were able to prevent inflammatory aspects such as: ulcer, hyperemia, edema and colonic prolapse when compared to the Colitis group. The CT 50mg/kg and Au@CT 50mg/kg group had a significant reduction in macroscopic scores, as well as in microscopic scores, when compared to the colitis group. For reduced glutathione, the seaweed CT 50mg/kg and Au@CT 50mg/kg prevented the consumption of GSH and impaired oxidative stress, proven by the reduction in the concentration of MDA when compared to the Colitis group. MPO activity showed a significant reduction in the group treated with CT 50mg/kg and Au@CT 50mg/kg. Pre-treatment, with Dexamethasone or CT 50mg/kg or Au@CT, at doses of 25 and 50 mg/kg, were able to decrease the levels of cytokines IL1-beta and TNF alpha, as well as preserving the glial cells of the plexus myenteric. We conclude that the alga *Cystoseira tamariscifolia* (CT) and gold nanoparticles biosynthesized with the extract of the alga *Cystoseira tamariscifolia* Au@CT have a potent biological potential capable of reversing the inflammatory, oxidative processes an exercise neuroprotection of Crohn's disease, in an experimental model induced by acetic acid.

Keywords: Inflammatory Bowel Disease. Crohn's disease. Alga *Cystoseira tamariscifolia*, Gold Nanoparticles.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 01-	Camadas da Parede do Cólon Intestinal Normal.	23
Figura 02-	Representação Esquemática da Regulação da Barreira Funcional Intestinal.	26
Figura 03 -	Atividades Biológicas Associadas a <i>Cystoseira</i> , um Importante Gênero Pertencente ao Grupo das Algas Castanhas.	30
Figura 04 –	Relação entre Características Importantes de Nanopartículas (NP) e Vantagens da Entrega de Compostos Mediada por Nanopartículas.	41
Figura 05-	Preparação do extrato aquoso da alga <i>Cystoseira tamariscifolia</i> (CT) e das nanopartículas de ouro biossintetizadas com o extrato de alga <i>Cystoseira tamariscifolia</i> (CT).	42
Figura 06 -	Principais Tipos de Nanopartículas e Estratégias para Atingir o Acúmulo nos Tecidos-Alvo, por Direcionamento Passivo ou Ativo (Incluindo Mediados por Ligantes).	43
Figura 07 -	Representação Esquemática do SNE do Intestino Delgado.	45
Figura 08-	Modelo Experimental da Doença de Crohn Induzida por Ácido Acético.	53
Figura 09 -	Avaliação macroscópica de atividade inflamatória (escore total) do cólon de camundongos tratados com o extrato da alga <i>C. tamariscifolia</i> (CT) no modelo de colite experimental por ácido acético 8%.	63

- Figura 10- Fotografias mostrando o aspecto macroscópico do cólon de camundongos tratados com o extrato da alga *C. tamariscifolia* (CT) no modelo de colite experimental por ácido acético 8%. **65**
- Figura 11- Avaliação macroscópica de atividade inflamatória (escore total) do cólon de camundongos tratados com nanopartículas de ouro biossintetizado com o extrato da alga *C. Tamariscifolia* (Au@CT) no modelo de colite experimental por ácido acético 8%. **67**
- Figura 12- Fotografias mostrando o aspecto macroscópico do cólon de camundongos tratados com nanopartículas de ouro biossintetizado com o extrato da alga *C. tamariscifolia* (Au@CT) no modelo de colite experimental por ácido acético 8%. **69**
- Figura 13 - Avaliação microscópica de atividade inflamatória (escore total). **71**
- Figura 14- Fotomicrografias do cólon de camundongos tratados com o extrato da alga *C. tamariscifolia* (CT) no modelo de colite experimental por ácido acético 8%. **73**
- Figura 15- Avaliação microscópica de atividade inflamatória (escore total). **75**
- Figura 16 - Fotomicrografias do cólon de camundongos tratados com nanopartículas de ouro biossintetizado com *C. tamariscifolia* (Au@CT) no modelo de colite experimental por ácido acético 8%. **77**

- Figura 17 - Efeito do extrato da alga da *C. tamariscifolia* (CT, painel A) e das nanopartículas de ouro biossintetizado com *C. tamariscifolia* (Au@CT, painel B) sobre os níveis de glutathiona reduzida (GSH). **78**
- Figura 18 - Efeito do extrato da alga *C. tamariscifolia* (CT, painel A) e das nanopartículas de ouro biossintetizado com *C. tamariscifolia* (Au@CT, painel B) sobre os níveis de malondialdéido (MDA). **82**
- Figura 19- Efeito extrato da alga *C. tamariscifolia* (CT, painel A) e das nanopartículas de ouro biossintetizado com *C. tamariscifolia* (Au@CT) sobre os níveis de mieloperoxidase (MPO). **86**
- Figura 20 - O extrato da alga *C. tamariscifolia* (CT) e as nanopartículas de ouro biossintetizado com *C. tamariscifolia* (Au@CT) diminuíram os níveis teciduais de TNF- α no modelo de colite experimental por ácido acético 8%. **90**
- Figura 21- O extrato da alga *C. tamariscifolia* (CT) e as nanopartículas de ouro biossintetizado com *C. tamariscifolia* (Au@CT) diminuíram os níveis teciduais de IL-1 beta. **91**
- Figura 22- Fotomicrografias representativas da imuno-histoquímica para marcação de GFAP nos plexos mioentéricos. **93**
- Figura 23- O extrato da alga *C. tamariscifolia* (CT) e das nanopartículas de ouro biossintetizado com *C. tamariscifolia* (Au@CT) diminui o número de células imunomarcadas para GFAP no modelo de colite experimental por ácido acético 8%. **94**

Figura 24-	Fotomicrografias representativas da imuno-histoquímica para marcação de S100 beta nos plexos mioentéricos.	96
Figura 25-	O extrato da alga <i>C. tamariscifolia</i> (CT) e das nanopartículas de ouro biossintetizado com <i>C. tamariscifolia</i> (Au@CT) diminui o número de células imunomarcadas para S100 beta no modelo de colite experimental por ácido acético 8%.	97

LISTA DE TABELAS

Tabela 01- Definições do Escore Endoscópico Simplificado para Doença de Crohn.....	28
Tabela 02-Compostos Isolados a Partir de Macroalgas com Respectiva Atividade Biológica.....	38
Tabela 03- Florotaninos Encontrados em Macroalgas Castanhas e as suas Respektivas Potenciais Atividades Biológicas.....	39
Tabela 04- Escore de Inflamação Através de Análise Macroscópica com a Utilização de Lupa Estereoscópica.....	56
Tabela 05- Escore de Inflamação por Análise Microscópica.....	57
Tabela 06 – Efeito da <i>C. tamariscifolia</i> (CT) sobre os escores macroscópicos totais de inflamação no cólon de camundongos com colite induzida pelo Ácido acético 8% (AA 8%)...	64
Tabela 07 – Efeito das nanopartículas de ouro biossintetizado com o extrato da alga <i>C. tamariscifolia</i> (Au@CT) sobre os escores macroscópicos totais de inflamação no cólon de camundongos com colite induzida pelo Ácido acético 8% (AA 8%).....	68

Tabela 08– Efeito do extrato da alga *C. tamariscifolia* (CT) sobre os escores microscópicos de inflamação no cólon de camundongos com colite induzida pelo Ácido acético 8% (AA 8%)...**72**

Tabela 09 – Efeito das nanopartículas de ouro biossintetizado com *C. tamariscifolia* (Au@CT) sobre os escores microscópicos de inflamação no cólon de camundongos com colite induzida pelo Ácido acético 8% (AA 8%).....**76**

Tabela 10 – Efeito do extrato da alga da *C. tamariscifolia* (CT) sobre os níveis de glutathione reduzida (GSH) no cólon de camundongos submetidos ao modelo de colite experimental por ácido acético 8% (AA 8%).....**80**

Tabela 11 – Efeito das nanopartículas de ouro biossintetizado com *C. tamariscifolia* (Au@CT) sobre os níveis de glutathione reduzida (GSH) no cólon de camundongos submetidos ao modelo de colite experimental por ácido acético 8% (AA 8%).....**81**

Tabela 12 – Efeito do extrato da alga *C. tamariscifolia* (CT) sobre os níveis de malondialdéido (MDA) no cólon de camundongos submetidos ao modelo de colite experimental por ácido acético 8% (AA 8%).....**84**

Tabela 13 – Efeito das nanopartículas de ouro biossintetizado com *C. tamariscifolia* (Au@CT) sobre os níveis de malondialdéido (MDA) no cólon de camundongos submetidos ao modelo de colite experimental por ácido acético 8% (AA 8%).....**85**

Tabela 14 – Efeito do extrato da alga *C. tamariscifolia* (CT) sobre os níveis de mieloperoxidase (MPO) no cólon de camundongos submetidos ao modelo de colite experimental por ácido acético 8% (AA 8%).....**88**

Tabela 15 – Efeito das nanopartículas de ouro biossintetizado com *C. tamariscifolia* (Au@CT) sobre os níveis de mieloperoxidase (MPO) no cólon de camundongos submetidos ao modelo de colite experimental por ácido acético 8% (AA 8%).....**89**

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA	Ácido Acético
AA 8%	Ácido Acético 8%
ANOVA	Análise de Variância
ARRIVE	Animal Research: Reporting In Vivo Experiments
ATP	Adenosina Trifosfato
Au@CT	Nanopartículas de ouro Biossintetizado com Extrato de Alga <i>Cystoseira tamariscifolia</i>
BHE	Barreira Hematoencefálica
CCR	Câncer Colorretal
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
CT	<i>Cystoseira tamariscifolia</i>
CU	Colite Ulcerativa
DEXA	Dexametasona
DC	Doença de Crohn
DII	Doença Inflamatória Intestinal
DPM	Desvio Médio Quadrático
DSS	Sulfato Sódio Dextrana
DTNB	(5,5'-ditiobis-(ácido 2-nitrobenzóico)
ECCO	European Crohn and Colitis Organization
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EPM	Erro Padrão da Média
GSH	Glutathiona
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio
H ₂ SO ₄	Ácido Sulfúrico
H ₃ PO ₄	Ácido Fosfórico
HSV 1 e 2	Vírus Herpes Simples Tipo 1 e Tipo 2
HTAB	hexadeciltrimetilamônio Bromídico
IL-1	Interleucina 1
IL-1 BETA	Interleucina 1 Beta
IL-6	Interleucina 6

IP	Intraperitoneal
KCL	Cloreto de Potássio
MDA	Malondialdeído
MPO	Mieloperóxidase
NaCl	Cloreto de Sódio
NaPO ₄	Fosfato de Sódio
NMOL//G	Nanomoles/grama
NPSH	<i>Grupos Sulfidrílicos Não Protéicos</i>
NFKB	Fator Nuclear Kappa Beta
NFT	Emaranhados Neurofibrilares
NPs	Nanopartículas
RCU	Retocolite Ulcerativa
ROS	Espécies Reativas ao Oxigênio
RPM	Rotação por Minuto
SNE	Sistema Nervoso Entérico
TBARS	Substâncias reativas ao Acido Tiobarbitúrico
TCA	Ácido Tricloroacético
TGI	Trato Gastrointestinal
TMB	Solução Cromogênica de Tetrametilbenzidina
TNBS	Ácido Tri-nitro-benzeno Sulfônico
TNF	Fator Necrose Tumoral
TNF- α	Fator Necrose Tumoral Alfa
UFC	Universidade Federal do Ceará
UI	Unidades Internacionais
μ L	Microlitro

SUMÁRIO

1.0	INTRODUÇÃO.....	22
1.1	Revisão Bibliográfica.....	22
1.1.1	Doenças Inflamatórias Intestinais (DII).....	22
1.1.2	Doença de Cronh (DC).....	25
1.1.3	<i>Cystoseira tamariscifolia</i>	29
1.1.3.1	Utilização das Algas.....	33
1.1.3.2	Metabólitos Primários e Secundários.....	35
1.1.3.3	Método de Extração de Metabólitos Secundários.....	36
1.1.3.4	Atividade Biológica das Macroalgas.....	36
1.1.4	Nanopartículas de Ouro.....	40
1.1.5	Sistema Nervoso Entérico.....	43
1.1.6	Células Gliais.....	47
2.0	JUSTIFICATIVA.....	50
3.0	OBJETIVOS.....	51
3.1	Objetivo Geral.....	51
3.2	Objetivos Específicos.....	51
4.0	MATERIAIS E MÉTODOS.....	52
4.1	Aspectos Éticos.....	52

4.2	Animais.....	52
4.3	Drogas e Reagentes.....	52
4.4	Obtenção do extrato da alga <i>Cystoseira tamariscifolia</i> (CT) e das nanopartículas de ouro da alga <i>Cystoseira tamariscifolia</i>.....	52
4.5	Modelo de Doença de Crohn (DC) experimental induzido pela administração do Ácido Acético (AA 8%) em camundongos.....	53
4.6	Grupos Experimentais.....	54
4.7	Procedimentos de eutanásia.....	55
4.8	Avaliação macroscópica.....	55
4.9	Avaliação microscópica.....	57
4.10	Avaliação de atividade da mieloperoxidase (MPO).....	58
4.11	Determinação dos níveis de Glutathiona Reduzida (GSH).....	58
4.12	Determinação dos níveis de Malondialdeído (MDA).....	59
4.13	Determinação dos Níveis das Citocinas IL-1beta e TNF-α.....	59
4.14	Imuno-Histoquímica para S 100beta e GFAP.....	60
4.15	Análise Estatística.....	61
5.0	RESULTADOS.....	62

5.1	Avaliação macroscópica do cólon de camundongos pré- tratados com o extrato da alga <i>C. tamariscifolia</i> (CT) no modelo de colite experimental por ácido acético 8% (AA 8%).....	62
5.2	Avaliação macroscópica de lesões no cólon de camundongos pré- tratados com nanopartículas de ouro biossintetizado com o extrato da alga <i>C. tamariscifolia</i> (Au@CT) no modelo de colite experimental por ácido acético 8% (AA 8%).....	66
5.3	Avaliação microscópica do cólon de camundongos pré-tratados o extrato da alga <i>C. tamariscifolia</i> (CT) no modelo de colite experimental por ácido acético 8% (AA 8%).....	70
5.4	Avaliação microscópica das lesões no cólon de camundongos pré- tratados com nanopartículas de ouro biossintetizado com <i>C. tamariscifolia</i> (Au@CT) no modelo de colite experimental por ácido acético 8% (AA 8%).....	74
5.5	Determinação dos níveis de glutathiona reduzida (GSH) no cólon de camundongos pré-tratados com o extrato da alga <i>C. tamariscifolia</i> (CT) (painel A) e pré-tratados com nanopartículas de ouro biossintetizado com <i>C. tamariscifolia</i> (Au@CT) (painel B) no modelo de colite experimental por ácido acético 8% (AA 8%).....	78
5.6	Determinação dos níveis de malondialdeído (MDA) no cólon de camundongos pré-tratados com o extrato da alga <i>C. tamariscifolia</i> (CT, painel A) e pré-tratados com nanopartículas de ouro biossintetizado com <i>C. tamariscifolia</i> (Au@CT, painel B) no modelo de colite experimental por ácido acético 8% (AA 8%).....	82

5.7	Determinação dos níveis de mieloperoxidase (MPO) no cólon de camundongos pré-tratados com extrato da alga <i>C. tamariscifolia</i> (CT, painel A) e pré-tratados com as nanopartículas de ouro biossintetizado com <i>C. tamariscifolia</i> (Au@CT, painel B) no modelo de colite experimental por ácido acético 8% (AA 8%).....	86
5.8	Efeito do extrato da alga <i>C. tamariscifolia</i> (CT) e das nanopartículas de ouro biossintetizado com <i>C. tamariscifolia</i> (Au@CT) nos níveis teciduais de TNF-alfa no modelo de colite experimental por ácido acético 8% (AA 8%).....	90
5.9	Efeito do extrato da alga <i>C. tamariscifolia</i> (CT) e das nanopartículas de ouro biossintetizado com <i>C. tamariscifolia</i> (Au@CT) nos níveis teciduais de IL-1 beta no modelo de colite experimental por ácido acético 8% (AA 8%).....	91
5.10	Efeito do extrato da alga <i>C. tamariscifolia</i> (CT) e das nanopartículas de ouro biossintetizado com <i>C. tamariscifolia</i> (Au@CT) sobre a imunomarcção para GFAP no modelo de colite experimental por ácido acético 8% (AA 8%).....	92
5.11	Efeito do extrato da alga <i>C. tamariscifolia</i> (CT) e das nanopartículas de ouro biossintetizado com <i>C. tamariscifolia</i> (Au@CT) sobre a imunomarcção para S100 beta no modelo de colite experimental por ácido acético 8% (AA 8%).....	95
6.0	DISCUSSÃO.....	98

7.0 CONCLUSÃO.....	102
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	103
APÊNDICE A- FÁRMACOS, REAGENTES E SOLUÇÕES.....	119

1- INTRODUÇÃO

1.1 Revisão Bibliográfica

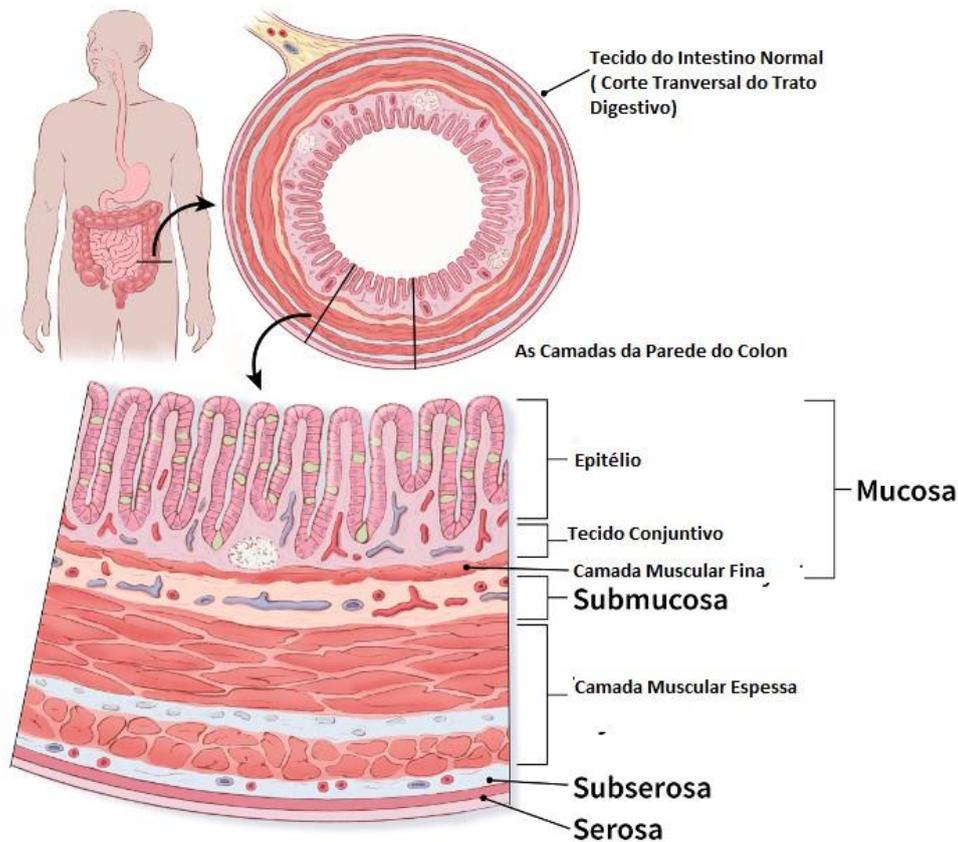
1.1.1. Doenças Inflamatórias Intestinais (DII)

O cólon e o reto fazem parte do aparelho digestivo, que também é denominado sistema digestório ou gastrointestinal (GI). A maior parte do intestino grosso é composta pelo cólon, um tubo muscular de aproximadamente 1,5 m de comprimento. As partes do cólon são denominadas pela forma como o alimento passa por elas (American Cancer Society,2020).

Cólon ascendente é a primeira seção do cólon começa com uma bolsa denominada ceco, por onde o alimento não digerido chega do intestino delgado, seguindo para cima no lado direito do abdômen. Cólon transverso a segunda seção do cólon atravessa o corpo da direita para a esquerda, o cólon descendente é a terceira seção do cólon, desce pelo lado esquerdo do abdômen, cólon sigmoide é a quarta seção do cólon, tem a forma em “S” é a parte final do cólon, o cólon sigmoide se junta ao reto, que então se conecta ao ânus, estes quando apresentam sua integridade preservada a nível de tecido e função desenvolvem suas atividades normalmente (figura 1) (American Cancer Society,2020).

As seções ascendentes e transversal juntas são chamadas de cólon proximal. Os cólons descendente e sigmóide são denominados cólon distal. O cólon absorve água e sal da matéria alimentar remanescente após passar pelo intestino delgado. Os resíduos que sobram após passar pelo cólon vão para o reto, os 15 cm finais do sistema digestivo, sendo armazenado lá até chegar ao ânus. Músculos em forma de um anel muscular (esfíncter) ao redor do ânus controlam a saída das fezes do corpo até que ocorra a evacuação (American Cancer Society,2020).

Figura 1- Camadas da Parede do Cólon Intestinal Normal.



Fonte: (American Cancer Society,2020).

As doenças inflamatórias intestinais (DII) são desordens inflamatórias crônicas complexas de causa amplamente desconhecida que ocorrem em um hospedeiro geneticamente predisposto (POCHARD, et al. 2018). As Doenças Inflamatórias Intestinais (DII) são caracterizadas por inflamação intestinal crônica e recidivante, com produção anormal de citocinas, aumento da expressão de moléculas de adesão e infiltrado celular, levando a um dano da mucosa e apoptose celular (MANDALARI, et al. 2011).

É crucial a determinação do grau de severidade ou atividade da ambas as doenças, uma vez que a gravidade, duração e a localização da doença são importantes na resposta ao tratamento (CARUSO, 2014).

A doença inflamatória intestinal (DII) representa um grupo de afecções intestinais inflamatórias crônicas idiopáticas. As duas principais categorias de DII são a doença de Crohn (DC) e a colite ulcerativa (CU) que apresentam algumas características clínico-patológicas sobrepostas e outras bem diferentes. A DC se

distingue da CU por apresentar envolvimento proximal do cólon, doença perianal, fístulas, granulomas histológicos e envolvimento de todas as camadas da parede intestinal, comparado com o envolvimento limitado à mucosa (WGO, 2015).

Diversos distúrbios ocasionados pela DII incluem alteração no Sistema Nervoso Entérico (SNE), aumento na percepção sensorial e na motilidade intestinal de modo a comprometer seriamente a função do órgão, a exemplo das recorrentes incontinências e urgência fecal (GEBOES.; COLLINS, 2002). Além disso, pacientes com DII têm um maior risco de desenvolver câncer colorretal (CCR), com uma probabilidade acumulada de 18% na RCU e 8% na DC após 30 anos de doença (POCHARD, et al. 2018). Não só a DII traz grande morbidade, como sua incidência vem aumentando nos últimos anos, configurando uma verdadeira epidemia mundial (ZHOU, et al. 2017). A incidência da DII é mais alta em países ocidentalizados, com os maiores índices no norte da Europa, América do Norte, Reino Unido e Austrália (KHORSHIDI, et al. 2020). É rara em países orientais, porém, a incidência nestes tem aumentado nos últimos anos (PARK.; JEEN, 2019). Aproximadamente 0,5% dos adultos dos países ocidentais sofrem de DII (MAGRO, et al. 2018).

Verificou-se um total de 46.546 internações por Doença de Crohn e Retocolite Ulcerativa no Brasil, no período de janeiro de 2009 a dezembro de 2019, dos quais 7.141 correspondem à idade de 30-39 anos, representando a maior porcentagem relativa para as idades analisadas. Além disso, observou-se que há uma prevalência no sexo feminino, contabilizando 24.929 internações (53,55%). Com relação à Região, o maior número encontra-se na Região Sudeste com 21.100 internações (BRITO, et al. 2020).

Os fatores mais implicados no estabelecimento e manutenção da inflamação intestinal são a genética e a microbiota do hospedeiro. Apesar disso, alguns fatores ambientais foram implicados, como localização geográfica, tabagismo, etilismo, apendicectomia, estresse e depressão, atividade física e padrão de sono (KHORSHIDI, et al. 2020).

1.1.2. Doença de Cronh (DC)

A DC se distingue da colite ulcerativa (CU) por apresentar envolvimento proximal do cólon, doença perianal, fístulas, granulomas histológicos e envolvimento de todas as camadas da parede intestinal, comparado com o envolvimento limitado à mucosa (WGO, 2015).

A DC é uma doença inflamatória transmural, ou seja, que pode acometer todas as camadas teciduais intestinais, afetando qualquer parte do trato gastrointestinal, desde a boca até o reto, no entanto, a localização mais frequente é na região ileocecal. A inflamação e ulceração são descontínuas, sendo comum o espessamento da parede do intestino, muitas vezes com granulomas (GÁLVEZ, et al. 2010).

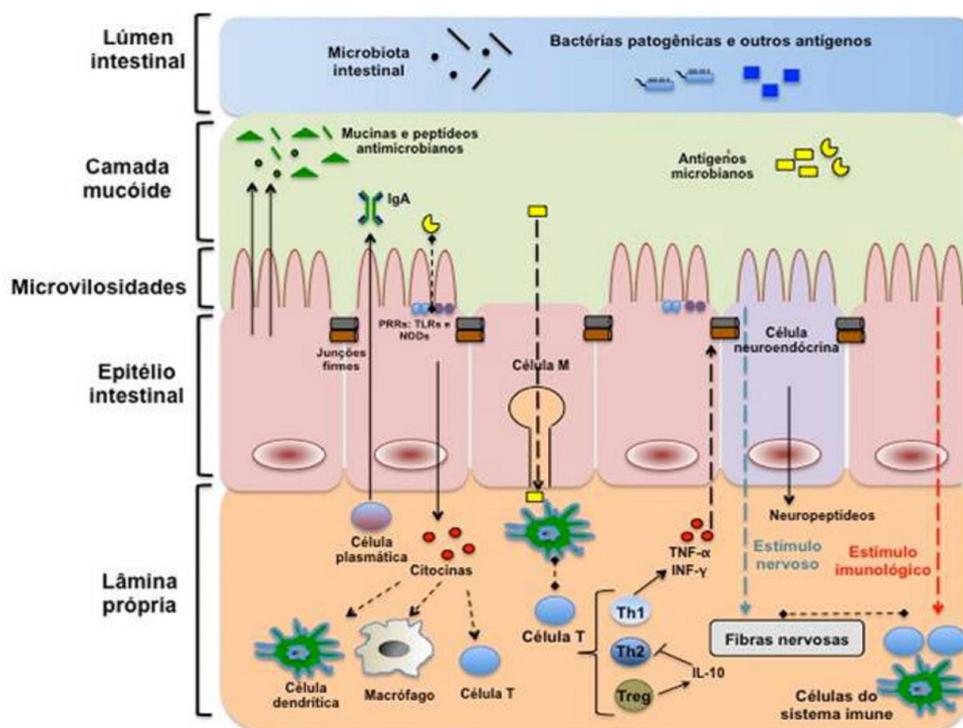
A inflamação crônica recorrente das Doenças Inflamatórias Intestinais (DII) incluindo a DC pode gerar alterações morfofuncionais no Sistema Nervoso Entérico (SNE), tais como alterações na secreção e motilidade intestinal, com redução e morte dos neurônios entéricos e consequente redução da liberação dos neurotransmissores (VICENTINI, et al. 2018).

As alterações da permeabilidade da mucosa intestinal estão entre as mais importantes complicações biológicas e fisiológicas causadas pela DC. As células epiteliais formam uma barreira justaposta e altamente seletiva entre o corpo e o microambiente intraluminal. Macromoléculas como antígenos bacterianos ou fecais, que em condições normais atravessam a barreira epitelial em pequenas quantidades, podem fluir em maior quantidade devido a inflamação (BINDER, 2009). Os pacientes com DC relatam sintomas gastrointestinais de dor abdominal, diarreia e sangramento retal, bem como sintomas sistêmicos de perda de peso, febre e fadiga. Além disso, podem desenvolver estenoses com obstrução intestinal e conexões inflamatórias entre os segmentos do intestino ou entre o intestino e a pele e outros órgãos (FUSS, et al. 2004).

Problemas no transporte intracelular, apoptose celular e defeitos nos complexos juncionais apicais são fatores que afetam a permeabilidade intestinal. O epitélio intestinal por possuir uma grande quantidade de complexos juncionais celulares é extremamente justaposto e possui uma grande variedade de mecanismos e suas junções celulares são responsáveis por manter o epitélio de revestimento interno do trato gastrointestinal (TGI) ocluído e controlando a passagem de solutos e solventes (MANKERT; SCHULZKE, 2007).

Na DC, as zônulas de oclusão e seus prolongamentos intercelulares são afetados, resultando em uma redução na malha juncional, tornando-a descontínua. Estes pontos descontínuos permitem a passagem de diversos antígenos, sejam eles alimentares ou bacterianos, além de água e eletrólitos pela barreira epitelial. O aumento na regulação dos processos apoptóticos das células epiteliais que revestem o intestino também é um importante mecanismo patológico da barreira epitelial. O aumento da apoptose celular contribui para a descontinuidade do epitélio que, em conjunto com redução das zônulas de oclusão, desregulam as funções físicas, biológicas, fisiológicas e imunológicas da mucosa gastrointestinal (SARTOR, 2006) (Figura 2).

Figura 02- Representação Esquemática da Regulação da Barreira Funcional Intestinal.



Fonte: (ORIÁ; BRITO, 2016).

Pacientes com DII possuem a chamada disbiose da microbiota, que é uma alteração nas espécies predominantes na microbiota do hospedeiro. Bactérias presentes em indivíduos saudáveis, que possuem atividades anti-inflamatórias, são substituídas por bactérias patogênicas, que deflagram um processo inflamatório crônico na mucosa intestinal (KIM; CHEON, 2017).

Pacientes com a DC sofrem uma desregulação da resposta imunológica causada por uma reação anormal da microflora intestinal. Em consequência, ocorrem alterações na barreira da mucosa epitelial incapacitando a distinção entre bactérias comensais e invasoras (THORESON; CULLEN, 2007). O diagnóstico da DC resulta da análise de dados clínicos (anamnese, exame físico e proctológico completo), endoscópico, radiológicos, laboratoriais e histológicos (FIOCCHI, 1998). Os sinais iniciais, em geral, são diarreia persistente, dor abdominal, febre moderada e perda de peso corporal (KOTZE, 2011).

A colonoscopia consiste em uma técnica capaz de visualizar diretamente o cólon permitindo o diagnóstico de afecções que acometem o intestino grosso até a parte final do intestino delgado (íleo terminal). Utilizada a partir de 1970, atualmente destaca-se como um dos métodos mais completos de investigação das doenças colorretais, incluindo as doenças inflamatórias intestinais sendo os dois principais tipos Doença de Crohn (DC) e Colite Ulcerativa (CU). Com vantagens sobre outros métodos de investigação, a colonoscopia proporciona observação da mucosa colônica e muitas vezes do íleo terminal, em tempo único e de forma direta, além de permitir realizar procedimentos durante o exame como biópsia (ROCHA, et al. 2019)

O estudo histológico das biópsias comprova o diagnóstico diferencial entre DC e CU, bem como diagnosticar displasia e câncer nos casos de colite de longa evolução. A coleta de material para análise histológica de todos os segmentos é mandatória, incluindo os macroscopicamente normais, pois a endoscopia digestiva na DII desempenha um papel importante com relação a: diagnóstico, prognóstico, vigilância do câncer, terapia e às perspectivas (LEIGHTON, et al. 2006).

Flores (2008) ressaltou que pacientes com CU e DC de cólon de longa duração (em média 10 anos) possuem um risco aumentado de displasia e câncer colorretal (CCR), sendo a vigilância colonoscópica mandatória. A CU que se apresenta apenas como proctite não possui risco aumentado de CCR.

No intuito de auxiliar no diagnóstico da DC, Daperno et al. (2004), criaram e validaram um escore endoscópico simplificado para avaliação da DC. Para a construção deste escore foram levadas em consideração 4 variáveis: úlceras, proporção da superfície coberta pelas úlceras, proporção de superfície coberta por outras lesões e estenoses. Classificando cada variável em uma pontuação de 0 a 3 anos diferentes segmentos resultado do seu respectivo escalonamento de acordo com os seguintes critérios: as úlceras foram classificadas conforme o seu tamanho

(diâmetro de 0,1-0,5 cm, 0,5-2 cm, ou >2 cm); a proporção da superfície ulcerada foram expressas em porcentagem (<10%, 10-30%, ou >30%) bem como a proporção da extensão da superfície afetada (<50%, 50-75%, ou >75%) e as estenoses foram avaliadas pelo número e pela possibilidade de serem ou não ultrapassadas pelo colonoscópio (Tabela 1).

Tabela 01- Definições do Escore Endoscópico Simplificado para Doença de Crohn.

Variável	Escore 0	Escore 1	Escore 2	Escore 3
Tamanho das úlceras	-	Úlceras aftóides 0,1 – 0,5 cm	Úlceras grandes 0,5 – 2cm	Úlceras maiores >2cm
Superfície ulcerada	-	<10%	10-30	>30%
Superfície afetada	-	<50%	50-75%	>75%
Presença de estenoses	-	Única, pode ser ultrapassada	Múltiplas, podem ser ultrapassadas	Não podem ser ultrapassadas

Fonte: (FLORES, C. 2008)

O manejo medicamentoso desses pacientes é complexo e envolve o uso de muitas classes de fármacos, os medicamentos mais utilizados são os derivados do ácido 5-aminossalicílico, os corticoesteróides, os agentes imunomoduladores e os medicamentos mais recentes, os agentes biológicos (CARDOZO; SOBRADO, 2015).

Bem como na RCU a conduta mais empregada na prática clínica é o “Step-up” com adição progressiva de medicações mais potentes e com maior possibilidade de efeitos colaterais conforme a não resposta ao tratamento máximo otimizado do grau anterior. Outra conduta cada vez mais utilizada na DC é o “top-down”, com utilização de terapia biológica desde o início do tratamento, podendo mudar a história natural da doença (FRÓES, 2012).

A estratégia “Step-up” baseia-se no uso precoce de terapia com anti-inflamatório e antibiótico no início da evolução da DC. Auxiliando a evitar nova recaída, e em caso de maior gravidade na evolução da DC, utiliza-se imunossupressores e corticóides. Reservam-se os agentes biológicos como última opção, na falha de ação dos medicamentos previamente utilizados ou na presença de complicações das doenças. No caso da estratégia “Top-down”, tem-se que o uso precoce de terapia

biológica pode trazer benefícios como um tratamento preventivo de complicações da DC (WGO, 2009; KOTZE L; KOTZE PG; KOTZE LR, 2011), podendo mudar a história natural das doenças (FRÓES, 2012).

O tratamento clínico da DC tem como metas principais o rápido controle inicial do processo inflamatório (indução da remissão) e a conservação deste controle no longo prazo (manutenção da remissão). Os corticosteroides modulam a resposta imune ao interagir com os receptores de glicocorticoides nos núcleos celulares. As principais funções dos corticosteroides incluem a interferência na expressão da molécula de adesão e posterior prevenção da migração de células inflamatórias para o trato gastrointestinal. Os corticosteroides minimizam a produção de citocinas pró inflamatórias, como IL-1 e IL-6, fator nuclear kappa Beta (NFkB) e fator de necrose tumoral (TNF). Os corticosteroides podem ser administrados por via oral (prednisona, prednisolona, budesonida), retal (acetato de cortisona e budesonida), ou parenteral (metilprednisolona, hidrocortisona ou dexametasona) (BOUGUEN, et al. 2015).

De acordo com o estágio da doença, a escolha do medicamento e o manejo clínico são adotados de forma individualizada de acordo com e resposta do indivíduo. Sabe-se, porém, os efeitos colaterais nos pacientes, a exemplo os corticóides que apresentam: aumento de peso, edema, insônia, labilidade emocional, psicose, acne, síndrome de Cushing, osteoporose, catarata, glaucoma, estrias, miopatia, susceptibilidade a infecções, esteatose hepática, hipertensão arterial sistêmica, diabetes mellitus e pancreatite aguda. Há ainda a ausência de resposta completa ao uso de corticóides orais ou a presença de corticodependência (FRÓES, 2012).

1.1.3. *Cystoseira tamariscifolia*

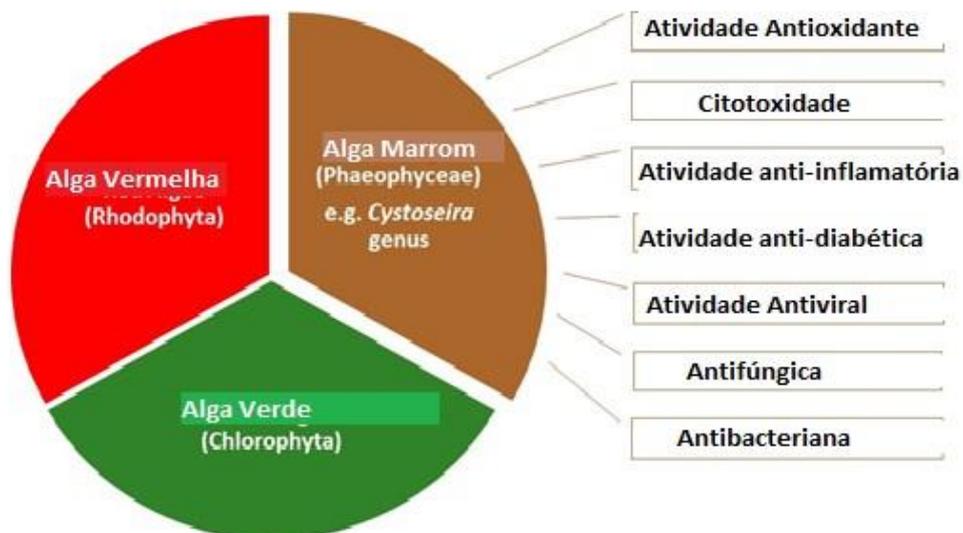
Nas últimas décadas, as macroalgas marinhas têm chamado a atenção principalmente por seus constituintes bioativos. A maioria das algas marrons está distribuída nas áreas costeiras do Oceano Atlântico, Mar Mediterrâneo, Mar Egeu e Mar Negro, e sua composição varia com fatores exógenos. Florotaninos, ácidos graxos, esteróis e carboidratos são alguns dos compostos responsáveis por atividades biológicas relacionadas ao potencial citotóxico, antiviral, antifúngico, antibacteriano, antidiabético, antioxidante e anti-inflamatório, estas duas últimas atividades biológicas, têm enorme importância para a gestão de doenças neurodegenerativas, como Alzheimer e Parkinson, tendo como marcas a neuroinflamação e o stress oxidativo (GONÇALVES, et al. 2023).

Expostos a condições ambientais extremas, os organismos marinhos produzem metabólitos secundários únicos, que foram reconhecidos como compostos importantes para o desenvolvimento de medicamentos inovadores. Parte da diversidade dos oceanos provém das algas, que constituem um dos mais importantes grupos de organismos, tanto em número como em diversidade de espécies (LOPES,2014).

As macroalgas, que compreendem um grupo variado de organismos, são organismos eucarióticos, macroscópicos e fotossintéticos e estão entre os maiores produtores de oxigênio da Terra (LOPES, 2014).

Segundo Pereira (2021), podem ser classificadas como macroalgas vermelhas, pertencentes ao filo Rhodophyta, verdes, pertencentes ao filo Chlorophyta ou marrons, pertencentes ao filo Ochrophyta, dependendo da composição de seus pigmentos, que serão responsáveis pelas diferentes cores que as caracterizam.

Figura 03 - Atividades Biológicas Associadas a *Cystoseira*, um Importante Gênero Pertencente ao Grupo das Algas Castanhas.



Fonte: (GONÇALVES, 2023).

As macroalgas marrons são agrupadas na classe Phaeophyceae e apresentam como principal carotenoide a fucoxantina, o que lhes confere uma coloração marrom típica. Incluem macroalgas com uma ampla gama de tamanhos e formas, desde alguns centímetros até dezenas de metros. A formação de florestas de algas é comum, permitindo a captação eficiente da luz solar e servindo de habitat para muitos animais marinhos (LOPES, 2014). Das aproximadamente 2.000 espécies conhecidas nesta classe, menos de 1% vive em água doce (WILCE, 1966). Das macroalgas marinhas, as algas marrons da família *Sargassaceae* têm sido intensamente estudadas. Quimicamente são compostos essencialmente por água (80-90%) e polissacarídeos, nomeadamente celulose, ácido algínico, laminarina e fucoidano, estando este último presente apenas nas algas castanhas. Outros compostos incluem ácidos graxos poliinsaturados, vitaminas, proteínas, peptídeos, terpenóides, pigmentos e esteróis. Além disso, e entre as algas marinhas, as algas marrons contêm os níveis mais altos de compostos fenólicos (IMBS, 2018). Um dos gêneros conhecidos desta família é o antigo gênero *Cystoseira*.

As algas castanhas, devido à presença de compostos bioativos na sua composição, são também já usadas devido à sua afinidade biológica, nomeadamente atividade antioxidante, anti-inflamatória, antimicrobiana e antifúngica (figura 03).

Este gênero representa um dos elementos mais importantes do ecossistema costeiro marinho (RUBERTO, et al. 2001), sendo essencial para a estrutura rochosa das florestas marinhas e garantindo alimento a inúmeras espécies de organismos que vivem nos recifes rochosos. Além disso, tem significativo valor econômico (BERMEJO, et al. 2016).

Este gênero (*Cystoseira*) tem sido amplamente estudada do ponto de vista químico e biológico, com a maioria dos estudos centrados em espécies das costas do Oceano Atlântico e do Mar Mediterrâneo, como por exemplo: *C. tamariscifolia*, *C. nodicaulis*, *C. usneoides*, *C. abies-marina*, *C. crinite* (atualmente designado como *Ericaria selaginoides*, *Gongolaria nodicaulis*, *Gongolaria usneoides*, *Gongolaria abies-marina*, *Ericaria crinite*, respectivamente), *C. sedoides* e *C. compressa* (MHADHEBI, et al. 2014; MONTEIRO, et al. 2014; FERRERES, et al. 2012).

A *Cystoseira* spp. distribui-se pelo Oceano Atlântico, Mar Mediterrâneo, Mar Egeu e Mar Negro (GUNER, et al. 2015; ORELLANA, et al. 2019) e sua composição varia de acordo com diversos fatores exógenos, como por exemplo sua localização geográfica, estação do ano e fatores ambientais, também os fatores endógenos, como

idade, espécie (BALBOA, et al. 2013; CAGALLI, et al. 2022). Com o passar dos anos foi descoberto que os solventes utilizados na extração desses metabólitos influenciam de forma significativa na constituição dos extratos e, conseqüentemente na sua atividade biológica (TRIFAN, et al. 2019; GUNER, et al. 2015; MHADHEBI, et al. 2014; MOHY, et al. 2018; MANSUR, et al. 2020; ; MHADHEBI, et al. 2012).

Foram listados compostos isolados a partir de diferentes espécies de macroalgas, para os quais existe já reportada uma atividade biológica bem definida.

A *Cystoseira tamariscifolia* (*C. tamariscifolia*) tem origem na costa do Atlântico. Esta espécie tem sido explorada pela sua capacidade de produzir compostos bioativos (LOPES, et al. 2011). Em relação à sua composição química, foi verificada a presença de vários esteróis em amostras recolhidas na costa Portuguesa, nomeadamente o campesterol, colesterol, desmosterol, ergosterol, fucosterol, estigmasterol e β -sitosterol (LOPES, et al. 2011). Segundo Andrade, et al. (2013) quantificaram diversos compostos provenientes de extratos desta macroalga colhida em Portugal, observando-se a presença de ácido hexadecanóico (29.60 ± 5.96 mg/100 g de alga seca), ácido octadecanóico (25.54 ± 1.20 mg / 100 g de alga seca) e fucosterol (34.62 ± 3.44 mg / 100 g de alga seca).

O fato de as macroalgas se encontrarem expostas a radiação ultravioleta origina a formação de radicais livres e outros oxidantes, estimulando a produção de compostos antioxidantes, nomeadamente os florotaninos, estes se destacam pelas várias atividades biológicas e utilizações na indústria farmacêutica (THOMAS, 2011). como forma de as espécies se protegerem dos danos estruturais nos seus órgãos, o que os torna em bons candidatos para a procura de compostos bioativos de origem natural (FERRERES, 2012; ZUBIA, 2009).

As macroalgas são organismos fotossintéticos que vivem no meio marinho, podendo estar presente tanto em água doce como em água salgada. Esta designação de macroalgas dá-se às algas multicelulares com órgãos diferenciados (GOUVEIA, et al. 2012). A família Cystoseiracea e pertence à Phaeophyta (Ordem Fucales, Classe Phaeophyceae) e inclui os géneros *Acrocarpia*, *Acystis*, *Bifurcariopsis*, *Carpoglossum*, *Caulocystis*, *Cocophora*, *Cystophora*, *Cystoseira*, *Halidrys*, *Hormophysa*, *Lundsburgia*, *Scaberia* e *Stolonophora* (Amico, 1995).

André (1970), que estudou exaustivamente a flora algal portuguesa no final da década de 60 (do século passado), identificou e descreveu 246 espécies de

Rhodophyceae, 98 Phaeophyceae e 60 Chlorophyceae, números que não se alteraram significativamente desde então (SOUSA-PINTO, 1998).

Para além do potencial nutricional, vários estudos descrevem as algas castanhas como ricas em compostos secundários bioativos com importantes propriedades biológicas como atividade antioxidante e antiproliferativa, duas características importantes para compostos com potencial utilização farmacêutica (VIZETTO, et al. 2015). Foram realizados estudos com seis espécies do gênero *Cystoseira*, nomeadamente *C. compressa*, *C. humilis*, *C. tamariscifolia*, *C. nodicaulis*, *C. baccatae*, *C. barbata*, além disso, especificamente, a espécie *C. tamariscifolia* mostrou ser a mais promissora em relação ao isolamento de compostos com potencial anticancerígeno, devido à sua forte atividade antioxidante, antiproliferativa e pro-apoptótica em células de hepatocarcinoma. Além disso, foi desta espécie que foram isolados os compostos estudados, demonstrando que esta macroalga da costa portuguesa possui um elevado potencial na obtenção de metabólitos de valor terapêutico (VIZETTO, et al. 2015).

1.1.3.1 Utilização das Algas

As macroalgas têm sido utilizadas de variadas formas como alimento, na cosmética, na agricultura, na aquicultura e na indústria alimentar e farmacêutica como fonte de ficocolóides e outros compostos químicos (LOPES, 2012).

Os ficocolóides extraídos/provenientes de macroalgas, tais como o ágar, o carragenano e o alginato, têm diversas aplicações na indústria alimentar, farmacêutica e cosmética como espessantes, gelificantes e estabilizantes de suspensões e emulsões (PEREIRA, 2008; PEREIRA, 2011). O ágar, por exemplo, é fundamental na biotecnologia, pois é usado na elaboração de meios de cultura gelificados (cultura de bactérias, algas, fungos e em cultura de tecidos), na obtenção de anticorpos monoclonais, interferons, alcaloides, esteroides. O ágar é ainda usado na separação de macromoléculas por eletroforese e na sequenciação de ácido desoxirribonucleico (DNA) (PEREIRA, 2011). O carragenano é utilizado na cosmética como agente de branqueamento, na alimentação, como por exemplo em pudins, sorvetes, gelatinas, entre outros, e ainda em aplicações farmacêuticas, onde tem apresentado um papel importante na redução do colesterol, no tratamento de úlceras gástricas, apresentando também atividade antitumoral, anti-inflamatória e antiviral. Por fim, a utilização alginato abrange a indústria farmacêutica e cosmética, como agente de

neutralização de metais pesados e radioativos e ainda podendo ser usado em compressas e ligaduras para queimaduras, ajudando na cicatrização (PEREIRA, 2011).

Tal como os outros organismos, as algas necessitam de sintetizar e transformar um vasto número de compostos orgânicos indispensáveis para estas viverem, crescerem e se reproduzirem. A produção destes compostos dá-se através de um conjunto de reações químicas, que ocorrem sequencialmente e se encontram organizadas em vias metabólicas, mediadas e reguladas por enzimas, que necessitam de energia na forma de ATP (DEWICK, 2002).

Apesar destes metabolitos não serem essenciais para o crescimento dos organismos, estes apresentam um papel indispensável para a proteção contra o *stress* abiótico e biótico, uma vez que, uma das funções ligada a estes metabolitos sintetizados é promover mecanismos de defesa contra agentes patogénicos e predadores (DIAS, 2012). Alguns destes metabolitos são exclusivos das algas (JIMÉNEZ-ESCRIG, 2012). Para além das funções que desempenham nestes organismos, estes metabolitos secundários são igualmente interessantes na medida em que muitos apresentam propriedades únicas para a saúde e no tratamento de certas doenças (SANTOS, 2015; HORTA, 2014).

As algas marinhas são conhecidas por serem um alimento nutritivo com baixo teor calórico, tendo na sua constituição proteínas, hidratos de carbono (acima designados por ficocolóides), compostos lipofílicos, compostos fenólicos, vitaminas e sais minerais (DOMÍNGUEZ, 2013; EL-SAID, 2013). As macroalgas são principalmente constituídas por água (80-90%); uma vez secas, estas contêm cerca de 50% de hidratos de carbono, 7-38% de minerais e uma pequena quantidade de compostos lipofílicos (1-3%), para além de quantidades menores de compostos fenólicos e vitaminas. Relativamente ao conteúdo proteico e ao teor de fibra (hidratos de carbono não digeridos pelo trato gastrointestinal) os valores são bastante variáveis. No caso do conteúdo proteico, este apresenta valores entre os 10 e os 47%, contendo quantidades elevadas de aminoácidos essenciais. A nível do teor de fibras, as macroalgas possuem valores entre os 33 e os 50% (EL-SAID, 2013). Para além disso, as algas são uma fonte de vitaminas solúveis (vitamina B, B2, B3, B5, B12 e C) e insolúveis (vitamina A, E D e K) e de minerais (cálcio, sódio, potássio, iodo, ferro, zinco, entre outros) (DOMÍNGUEZ, 2013; EL-SAID, 2013).

A parede celular das macroalgas é constituída por polissacarídeos, maioritariamente celulose, ulvano, alginato, fucoidanos, laminarina, carragenano e agar. O ulvano é característico das algas verdes, o carragenano e o agar das algas vermelhas, em contrapartida, os alginatos, fucoidanos e as laminarinas são típicos das algas castanhas (PEREIRA, 2011).

1.1.3.2 Metabólitos Primários e Secundários

Como outros organismos, as algas necessitam sintetizar e transformar compostos orgânicos indispensáveis para sua sobrevivência, crescimento e reprodução. Através de um conjunto de reações químicas produzem estes compostos, estas reações ocorrem sequencialmente e se encontram organizadas em vias metabólicas, mediadas e reguladas por enzimas, que necessitam de energia na forma de ATP (DEWICK, 2002). Estas vias são comuns em todos os organismos, apresentando apenas pequenas variações, constituindo o denominado metabolismo primário, sendo os compostos envolvidos descritos como metabólitos primários. Em contrapartida, os compostos sintetizados por outras vias e que não são considerados essenciais para a sobrevivência das espécies são sintetizados pelo designado metabolismo secundário e intitulados de metabólitos secundários, porém estes apresentam uma distribuição mais limitada na natureza (DEWICK, 2002).

Apesar dos metabólitos secundários não serem essenciais para o crescimento dos organismos, possuem um papel protetor indispensável contra o *stress* abiótico e biótico, uma vez que, uma das funções ligada a estes metabólitos sintetizados é promover mecanismos de defesa contra agentes patogénicos e predadores (DIAS, 2012). Alguns destes metabólitos são exclusivos das algas (JIMÉNEZ-ESCRIG, et al. 2012). Para além das funções que desempenham nestes organismos, estes metabólitos secundários são igualmente interessantes na medida em que muitos apresentam propriedades únicas para a saúde e no tratamento de certas doenças (SANTOS, et al. 2015; HORTA, et al. 2014).

1.1.3.3 Método de Extração de Metabólitos Secundários

A identificação e caracterização de metabólitos secundários presentes em algas envolve uma primeira fase de recolha de amostra para depois se proceder à extração dos respetivos componentes. De uma forma geral, as macroalgas são colhidas em zonas costeiras, sendo posteriormente lavadas, a fim de remover sal ou impurezas. Para se poder proceder à extração, as algas têm de ser secas e moídas de forma a obter uma amostra homogénea (KADAM, et al. 2013).

A escolha do solvente de extração é essencial para a composição final do extrato obtido. Esta escolha irá depender da polaridade dos compostos que se pretende extrair, podendo se tratar de um mistura de solventes se assim for necessário. Têm sido utilizados um grande número de solventes, como por exemplo, a água, acetona, tolueno, hexano, ciclo-hexano, metanol, etanol, clorofórmio e diclorometano (STARMANS, 1996; RAMLUCKAN, et al. 2018). Extrato lipofílicos de algas têm sido extraídos com sucesso usando o diclorometano como solvente (SANTOS, 2015).

A extração de compostos a partir de amostras sólidas é de uma forma geral realizada pelo método de extração sólido-líquido (LUQUE DE CASTRO, 1998). A escolha do método mais adequado varia de acordo com a natureza dos compostos alvo, de forma a obter-se o maior rendimento e pureza possíveis (KADAM, 2013). A fim de extrair compostos lipofílicos, a extração em Soxhlet tem sido utilizada como técnica de referência (SANTOS, 2015; VILELA, 2014; RAMOS, 2013). Esta é uma técnica relativamente barata e simples, permitindo obter um rendimento de extração mais elevado do que a maioria dos outros métodos (por exemplo a extração com fluidos supercríticos ou extração por micro-ondas) (LUQUE DE CASTRO, 1998).

1.1.3.4. Atividade Biológica das Macroalgas

As algas castanhas, devido à presença de compostos bioativos na sua composição, são também já usadas devido à sua afinidade biológica, com atividades antioxidante, anti-inflamatória, antimicrobiana e antifúngica (SANTOS, et al. 2015). Na Tabela 2 estão listados compostos isolados a partir de diferentes espécies de macroalgas, para os quais existe uma atividade biológica bem definida.

Para além destes compostos, também se destacam os florotaninos, devidas às várias atividades biológicas (Tabela 3), com vista à sua utilização na indústria farmacêutica (THOMAS, 2011).

Anti-inflamatórias e antioxidantes, essas são duas atividades biológicas de grande importância para a prevenção e tratamento de diversas doenças, algumas delas na área da neurologia. Entre as doenças neurodegenerativas cada vez mais prevalentes no mundo, as doenças de Alzheimer e Parkinson se destacam como duas das mais debilitantes (KOVACS, 2017), apresentando neuroinflamação e estresse oxidativo como características (JORDA, et al. 2020), e para os quais ainda não existe tratamento, o que faz com que a prevenção seja de extrema importância. A neurodegenerativa mais comum é a doença de Alzheimer, ocorrendo principalmente em pessoas com mais de 65 anos, principalmente em mulheres (ASSOCIATION, 2020). Estima-se que nos Estados Unidos existam cerca de 13,8 milhões de pessoas que sofrem de demência, sendo o Alzheimer a doença demencial mais frequente (ASSOCIATION, 2020). Esses tipos de doenças tornam os pacientes muito debilitados, onde geralmente são necessários cuidadores tanto no nível hospitalar quanto em casa, e esses cuidados incorrem em altos custos. Esta doença é caracterizada por perda de neurônios, proliferação de células da glia e acúmulo de emaranhados neurofibrilares (NFT).

Tabela 2- Compostos Isolados a Partir de Macroalgas com Respectiva Atividade Biológica

Classes de compostos	Composto(s)	Atividade biológica	Macroalga	Ref.
Ácidos Graxos	Ácido estearidónico	Atividade antimicrobiana	<i>Enteromorpha linza</i>	(PARK N-H, et al. 2013)
	Ácido γ -linolénico PUFAs ω 3 e ω 6	Redução do risco de doenças cardiovasculares		(MIYASHITA, 2013)
Esteróis	β -sitosterol Fucosterol	Redução do colesterol Anti-diabetes	<i>Pelvetia siliquosa</i>	(PAL, 2014); (LEE YS, et al. 2004)
	8,10,18-tri-hidroxi-2,6-dolabeladieno	Inibição da infecção de HSV 1;	<i>Dictyota pfaffii</i>	(ABRANTES, et al. 2010)
Diterpenos	(6R)-6-hidroxicotoma-1,14-dieno-1,17-dial	Diminuição do teor de proteínas precoces de HSV 1	<i>Dictyota menstrualis</i>	
Polissacarídeos	Galactofucanos Fucoidanos	Inibição da infecção do HSV 1 e 2	<i>Adenocystis utricularis</i>	(TRINCHERO, et al. 2009; YANG C, et al. 2008; KIM K-H, et al. 2006)
	Laminarina	Anti-tumoral Anti-apoptótica	<i>Undaria pinnatifida</i> <i>Laminaria japonica</i>	

Fonte: (adaptado de (TRINDADE, 2016)).

Tabela-3 Florotaninos Encontrados em Macroalgas Castanhas e as Suas Respectivas Potenciais Atividades Biológicas.

FLOROTANINOS	ATIVIDADE BIOLÓGICA
6,6'-Biecol Florofucofuroecol B Ecol e Diecol	Anti-alérgico
Dioxinodesidroecol	Anti-cancerígeno
Diecol Ecol Florofucofuroecol Difloreto-hidroxicarmalol	Anti-diabético
Diecol Ecol	Anti- fotoenvelhecimento
Ecol Florofucofuroecol Diecol	Anti-hipertensão
6,6'-Biecol 8,8'-Biecol 8,8'-Diecol	Anti vírus da imunodeficiência humana (Anti HIV)
8,8'-Biecol Florofucofuroecol-A Ecol Diecol	Antioxidante
Diecol Ecol e Fucofuroecol-A	Inibição da metaloproteínase da matriz

Fonte: (adaptado de (THOMAS, 2011))

1.1.4. Nanopartículas de Ouro

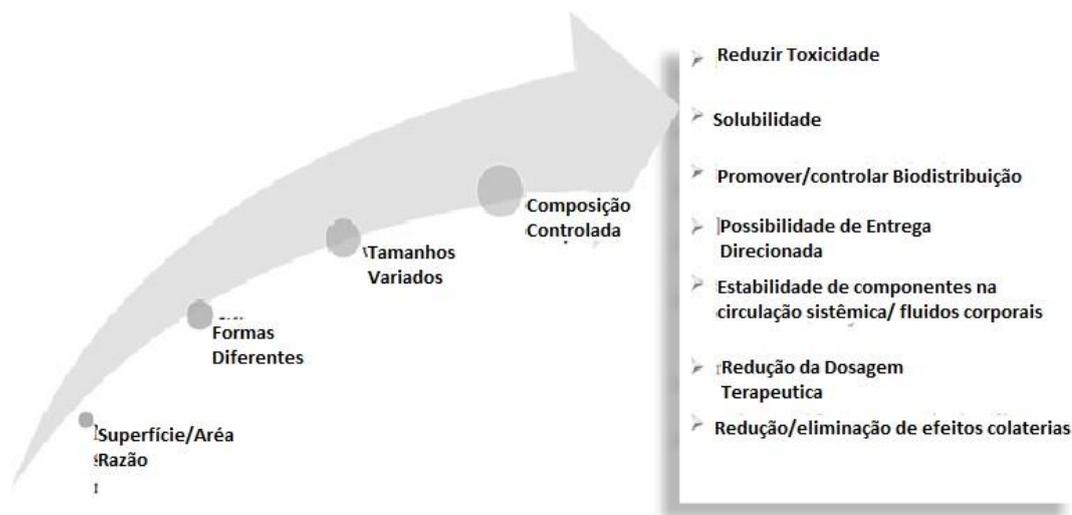
Nos últimos anos, o desenvolvimento de métodos eficientes de química verde para síntese de nanopartículas de metal surgiu como uma alternativa ecológica para a produção de nanopartículas bem caracterizadas (CHOUDHARY, 2018). Atualmente, as nanopartículas de ouro estão em uso intensivo devido às suas atraentes propriedades físico-químicas e biológicas, bem como às suas possíveis aplicações no desenvolvimento de novas tecnologias para nanomedicina, tanto em terapia quanto em diagnóstico (QUIN, et al. 2018; PRADO-LÓPEZ, et al. 2018)

A síntese verde de nanopartículas também é um tema bastante atual, o que permite aproveitar ao máximo as propriedades terapêuticas, evitando o uso de materiais altamente tóxicos e demonstrando ser uma técnica ecologicamente correta e de baixo custo (RAJESHKUMAR, et al. 2021; MACHADO, et al. 2021).

Um dos objetivos da utilização de NPs em nanomedicina é o transporte de substâncias, particularmente compostos bioativos para os tecidos e células alvo, considerando esta função, a combinação de macroalgas e NPs pode potencializar a sua eficácia terapêutica e reduzir ainda mais a eventual toxicidade das substâncias transportadas (MUKHERJEE, 2013).

Os sistemas de administração de medicamentos podem superar alguns dos maiores problemas na administração de medicamentos, como falta de especificidade, baixa biodistribuição, eficiência reduzida, falta de seletividade e efeitos colaterais (Figura 4) (GONÇALVES, 2023). O pequeno tamanho das NPs (1 a 100 nm), confere a elas propriedades únicas, como a relação superfície/área e potentes carreadores de fármacos (CABRERA, 2014). Além disso, suas diferentes formas, tamanhos e composições, têm mostrado enorme importância na medicina, tendo aplicabilidade no diagnóstico e terapia de doenças (MARCHANT, 2009). Possuem vantagens na redução da concentração dos fármacos, redução da toxicidade, melhoria da solubilidade, proteção dos fármacos durante a circulação e prevenção da degradação (LEE, et al. 2006; NOOLI, et al. 2017).

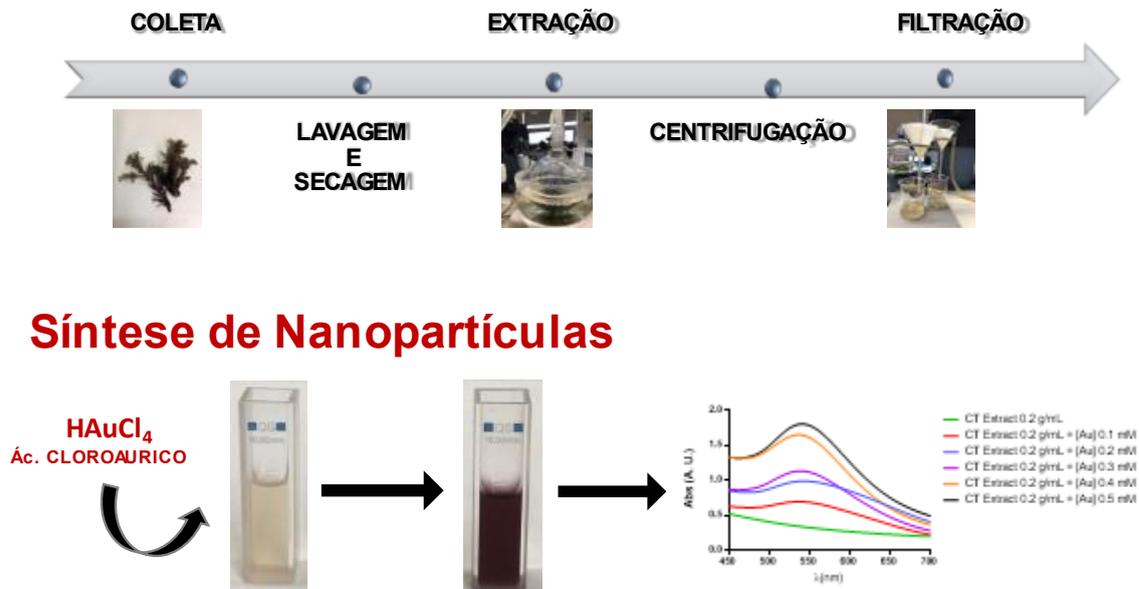
Figura 4- Relação entre Características Importantes de Nanopartículas (NP) e Vantagens da Entrega de Compostos Mediada por Nanopartículas.



Fonte: (GONÇALVES, et al. 2023).

Embora o uso de compostos naturais de origem marinha possa ser útil no tratamento e/ou prevenção de certas doenças neurológicas, muitas vezes é difícil garantir que a quantidade adequada do composto desejado chegue ao local alvo. Desta forma, a atividade biológica das macroalgas pode ser potencializada por nanocarreadores que entregam os extratos de algas ou compostos derivados às células, tecidos ou órgãos desejados. Para se obter a formação do extrato aquoso da alga CT e para a formação de nanopartículas de ouro, segue-se alguns passos e após adiciona-se o sal de ouro ao extrato da alga CT em temperatura ambiente onde é monitorada a reação por espectroscopia UV-Vis. A mudança de cor observada e o aparecimento da banda de ressonância superficial (SPR) característica das nanopartículas de ouro em 537 nm, permitem confirmar a redução e formação de nanopartículas de ouro (figura 5) (GONÇALVES, et al. 2023).

Figura 5- Preparação do extrato aquoso da alga *Cystoseira tamariscifolia* (CT) e das nanopartículas de ouro biossintetizadas com o extrato de alga *Cystoseira tamariscifolia* (CT).



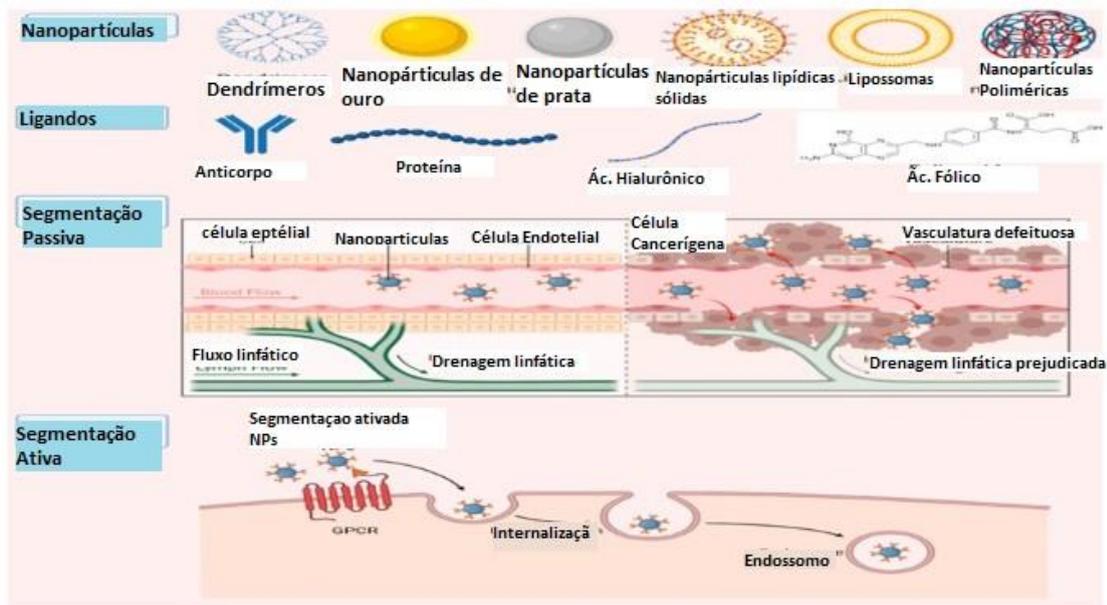
(GONÇALVES, et al. 2023).

Além disso, as propriedades de algumas nanopartículas (NPs) podem ter atividades sinérgicas com os extratos de algas, nomeadamente anti - propriedades inflamatórias, antioxidantes, antifúngicas e antibacterianas. A nanotecnologia tem crescido a ponto de suas aplicações atingirem diversas áreas, desde a indústria de alimentos e agricultura, até o processamento e embalagem de produtos alimentícios, cosméticos, indústria têxtil, indústria farmacêutica e medicina (SCOTT, et al. 2018; YETSEN, et al. 2016). Desta forma, também serão abordadas aplicações de NPs em medicina, diagnóstico, imagem e terapia de doenças. Uma das aplicações mais significativas de NPs é na entrega de drogas (MUKHERJEE, 2013).

As NPs são frequentemente divididas em dois grupos: nanocarreadores orgânicos e inorgânicos. NPs inorgânicos incorporam principalmente partículas metálicas. Neste grupo podemos constatar que alguns dos mais comuns consistem em nanotubos de carbono, ouro, prata e NPs magnéticos, entre outros. Micelas,

lipossomas, NPs lipídicas sólidas e dendrímeros se encaixam no tipo orgânico de carreadores. As NPs são muito versáteis e possuem inúmeras aplicações na área da biomedicina, figura 6 (GONÇALVES, et al. 2023).

Figura 6- Principais Tipos de Nanopartículas e Estratégias para Atingir o Acúmulo nos Tecidos-alvo, por Direcionamento Passivo ou Ativo (Incluindo Mediados por Ligantes).



Fonte: (GONÇALVES, et al. 2023).

1.1.5-Sistema Nervoso Entérico

Estendendo-se da boca até o ânus, percorrendo as cavidades: torácica, abdominal e pélvica constitui-se o TGI; no indivíduo vivo, ele mede aproximadamente 5 a 7 metros. É composto pela cavidade oral, orofaringe, esôfago, estômago, intestino delgado e intestino grosso. O TGI juntamente com os órgãos acessórios da digestão (dentes, língua, glândulas salivares, fígado, vesícula biliar e pâncreas) contribui de forma direta para a manutenção da homeostasia, sendo uma via de obtenção de energia para o indivíduo (TORTORA & DERRICKSON, 2010).

O sistema nervoso entérico (SNE) é uma divisão do sistema nervoso, o qual se apresenta constituído por células nervosas organizadas formando uma rede neural localizado na parede dos órgãos do trato gastrointestinal. É composto por dois grandes plexos nervosos interconectados, o plexo mioentérico e o plexo submucoso

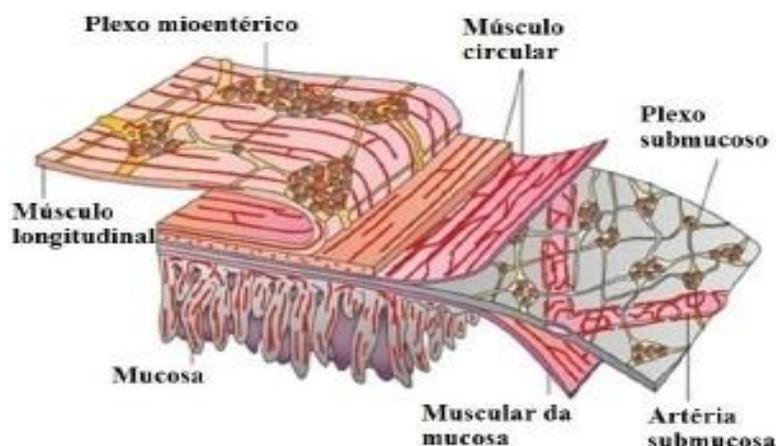
(FURNESS & COSTA, 1987).

O plexo mioentérico ou de Auerbach localiza-se entre a túnica muscular longitudinal externa e a túnica muscular circular interna, estendendo-se ao longo do trato digestório, desde o esôfago até o reto (FURNESS, 2006). O plexo submucoso (Meissner) é proeminente nos intestinos delgado e grosso e, localiza-se abaixo da mucosa e junto à camada circular do músculo liso. Suas malhas são menores do que o plexo mioentérico, suas fibras interconectadas são mais finas e o gânglio é menor (FURNESS, 2006).

Por interferir nas funções fisiológicas do SNC, afetando as vias de neurotransmissores, as alterações na microbiota intestinal podem estar correlacionadas às funções do sistema nervoso central. O sistema nervoso entérico consiste em aproximadamente 100 trilhões de neurônios que se estendem do esôfago ao ânus. Estes, estão dispostos em dois plexos o mioentérico e o submucoso. Neurônios pós ganglionares simpáticos, presentes no sistema nervoso autônomo (SNA), fazem sinapses com os neurônios localizados nos plexos mioentérico e submucoso (TORTORA; DERRICKSON, et. al. 2012).

Com a evolução das técnicas de imuno-histoquímica, os neuromediadores do SNE começaram a ser estudados e foi possível identificar até o momento, ao redor de 14 tipos funcionais de neurônios entéricos, incluindo os neurônios motores (excitatórios e inibitórios), interneurônios e neurônios sensoriais que controlam as funções gastrintestinais (FURNESS, 2006a). A rede neural do plexo mioentérico está envolvida com a regulação reflexa das atividades contráteis da musculatura externa, enquanto os neurônios motores do plexo submucoso estão relacionados com o controle das atividades secretomotora e vasomotora da túnica mucosa (FURNESS, et al. 2003) (Figura 7).

Figura 7- Representação Esquemática do SNE do Intestino Delgado.



Fonte: (FURNESS,2003).

A literatura tem demonstrado que o SNE é muito afetado nas doenças inflamatórias intestinais, com necrose, apoptose e degeneração dos gânglios entéricos (GEBOES & COLLINS, 1998; LOMAX, et al. 2005). Segundo Koberle (1968), para o desenvolvimento do megacólon ou do megaesôfago é preciso que haja uma destruição neuronal acima de 50% e de 80%, respectivamente. Nos modelos de indução química, um agente exógeno é administrado para indução da DII, por exemplo, ácido acético, ácido trinitrobenzenosulfônico (TNBS), sulfato sódico de dextrana (DSS) (MORRIS, et al. 1989).

Também em ratos, o modelo de administração anal de ácido acético induz modelo de indução aguda que vem sendo utilizado extensamente em animais, uma vez que permite rapidamente a formação do processo inflamatório, sendo possível observar alterações após 12 horas de sua administração (FILMANN, 2007). Reproduz um processo inflamatório no colón com formação de abscessos crípticos, infiltrado de leucócitos, edema de submucosa e ulceração da mucosa (SALLES, et al. 2019).

No trato digestório a isquemia/reperfusão intestinal (I/R-i) promove a perda significativa dos neurônios do plexo mioentérico e submucoso, bem como uma diminuição da densidade e do tamanho dos neurônios, resultando em alterações importantes da motilidade intestinal (PAULINO, et al. 2011; PALOMBIT, et al. 2013). Em modelos de desnutrição, houve uma recuperação do peso corporal e do perfil de células neuronais no plexo mioentérico em animais inicialmente privados de alimentos e

posteriormente realimentados, mostrando a capacidade de regeneração dos neurônios mioentéricos após a desnutrição (CASTELUCCI, et al. 2002). No modelo experimental de inflamação intestinal tem sido possível constatar alterações na diminuição dos neurônios dos gânglios entéricos, anormalidade nas funções contráteis e secretora do colo distal associados com diarreia (COLLINS, 1996; GALEAZZI, et al. 2000, JACOBSON, et al. 1997).

Da Silva et al. (2017) demonstraram que neurônios secretomotores, vasodiladores, IPANs e células gliais entéricas são afetados pela DC e CU. Também foi demonstrado que os neurônios do plexo mioentérico foram afetados na densidade em seu perfil neuronal (SILVA et al., 2015).

Desordens gastrointestinais causadas pelas DIIs, como a inflamação estão relacionadas a alterações da motilidade, tipicamente envolvendo comprometimento funcional e dano estrutural do SNE, sendo sua recuperação possível apenas pela restauração da função neural, onde a proliferação axonal pode reestabelecer conexões perdidas (VENKATARAMANA et al., 2015). Gulbransen et al. (2012), comprovam que a inflamação intestinal pode causar distúrbios na transmissão neuromuscular entérica inibitória no cólon, assim como a morte dos neurônios entéricos, contribuindo dessa forma para alterações na motilidade intestinal negativamente a longo prazo.

Estes trabalhos demonstram que a complexidade neuroquímica do SNE é ainda maior do que se imaginava e suscitam a necessidade da realização de mais trabalhos que visem a sua caracterização, principalmente em patologias gastrintestinais, como a doença de Crohn, diverticulites e colite ulcerativa, onde estas fazem parte das DII, nas quais o perfil neuroquímico do SNE estaria alterado.

1.1.6 Células Gliais

Rudolf Virchow (1846), patologista alemão, observou as células gliais pela primeira vez, como uma substância “macia, medular e de natureza frágil”, contrastando com o tecido fibroso dos neurônios, como se aquelas fossem a cola mantenedora destes, originando o nome neuroglia (“nerve-glue”). Até a década de 50, a neuroglia era vista como um mero suporte estrutural, a partir da década de 70 as células gliais começaram a ser vistas não mais apenas como suporte mecânico e metabólico, mas também como uma estrutura funcional no sistema nervoso central. As células da glia apresentam diferentes tipos morfológicos, as células localizadas exclusivamente no sistema nervoso central (SNC), incluem astrócitos, oligodendrócitos, micróglia e células ependimárias (KIMELBERG, H.K. ; NOREMBERG, M. D., 1989).

A primeira descrição das células da glia entérica foi feita por Dogiel (DOGIEL., 1899). Células gliais entéricas são descritas como pequenas células de forma estrelada que interconectam neurônios dentro dos gânglios entéricos e feixes de fibras nervosas (GABELLA G. 1972).

As marcações de células gliais entéricas também podem ser feitas pela proteína S100 beta em experimentos imuno-histoquímicos, uma proteína ligante de Ca^{2+} que tem como função auxiliar no controle da homeostase intracelular desse íon, através da mediação de ATP extracelular (FERRI et al., 1982b; HANANI et al., 2000; ZHANG et al., 2003; MENDES et al., 2015).

Uma das principais funções das glias entéricas, segundo a literatura é o auxílio na sustentação estrutural do sistema nervoso entérico, porém estudos mais recentes constataram que esta população de células tem participação relevante na fisiopatologia de reações inflamatórias, condições de dismotilidade intestinal e são afetadas pela colite (BASSOTTI et al, 2007; DA SILVA et al., 2015; 2017). Além de serem essenciais para a manutenção da vitalidade dos neurônios, exercem atividades imunológicas (como células apresentadoras de antígenos), proteção de neurônios em desordens intestinais causadas por diabetes e funções homeostáticas (BASSOTTI et al., 2007; LUO et al., 2018).

Apresentando um papel complexo no SNE, as células gliais entéricas

exercem influência na sobrevivência dos neurônios, durante o desenvolvimento ou após uma lesão intestinal fazem neurogênese e também atuam na modulação de processos fisiológicos (GULBRANSEN; SHARKEY, 2012).

Degeneração do epitélio da mucosa, dismotilidade e má absorção de nutrientes por parte dos segmentos intestinais, são algumas das disfunções observadas após alterações das glia entéricas, demonstrando assim a influência direta da homeostase glial na digestão e na neurotransmissão entérica (OKURA et al., 2019).

As células gliais entéricas maduras expressam proteína fibrilar ácida glial (GFAP), vimentina e S100 e para sua identificação utiliza-se frequentemente métodos imunohistoquímicos como a marcação de células que expressam GFAP e S100 (HAGSTRÖM; OLSSON, 2010; RÜHL; NASSER; SHARKEY, 2004).

No SNE a GFAP é considerada um marcador de células gliais entéricas e sua expressão é modulada por proliferação de células gliais entéricas, diferenciação e inflamação (CIRILLO et al., 2011). O aumento dos níveis de GFAP em processos inflamatórios tem sido relatado e essas observações indicam que a expressão de GFAP é dinamicamente regulada e reflete o estado funcional de uma célula glial entérica, mas são necessários mais estudos para compreender melhor suas funções (RÜHL, 2005; RÜHL; NASSER; SHARKEY, 2004).

A S100 é uma proteína ligante de cálcio que pode ser encontrada no citoplasma/núcleo. É o marcador que tem sido mais utilizado, é considerado um pan-glial no SNE, e tem algumas funções, como a regulação da estrutura e função do citoesqueleto e a homeostase de cálcio no citoplasma das células gliais entéricas (GONZALEZ-MARTINEZ et al., 2003; HSIEH et al., 2004; RÜHL, 2005).

Estudos sobre a marcação de células gliais através da marcação imunohistoquímica da proteína fibrilar glial ácida (GFAP), foram feitos por Jessen e Mirsky (1983). Assim, foi comprovado os efeitos da colite ulcerativa em humanos ou em protocolos de animais nas glia entéricas imunorreativas ao GFAP e ao S100 beta do SNE de pacientes com colite ulcerativa através de testes com o Fator Neutrónico Derivado da Glia (GDNF) em biópsias desses pacientes (VON BOYEN et al., 2011; DA SILVA et al., 2015; 2017).

Ao longo das últimas décadas, o conhecimento sobre o papel das células da

glia vem expandindo, acreditava-se que as células gliais limitavam as suas funções em promover defesa do sistema nervoso contra agentes patógenos, remover neurônios mortos, formar a bainha de mielina, nutrir e dar sustentação aos neurônios, porém, essas células também apresentam as seguintes funções: guiar os neurônios em sua migração e os axônios no seu crescimento; diferenciação neural; manter a homeostase neuronal, regulando o pH extracelular, tamponando os níveis de íons extracelulares como o K^+ , Na^+ e lactato; participar na formação da barreira hemato-encefálica, intermediando o transporte de substâncias entre o sangue e os neurônios; sintetizar e liberar compostos neurotróficos; formar tecido cicatricial em resposta à perda neuronal e participam de respostas imune (LENZ, G., 1996).

O SNE também contribui juntamente com as células gliais entéricas para a manutenção da integridade da barreira epitelial entre o lúmen do intestino e as células da parede intestinal (FURNESS, 2012; SAVIDGE et al., 2007; TOUMI et al., 2003).

2.0 JUSTIFICATIVA

Com 1,5 milhão de portadores na América do Norte, 2 milhões na Europa e 1,5 milhão de pessoas no restante do mundo, estima-se que 5 milhões de pessoas sejam acometidas pela doença inflamatória intestinal. Existindo ainda, as subnotificações ou não notificações atribuídas a doenças global do século XXI, da qual fazem parte a Colite Ulcerativa (CU) e Doença de Crohn (DC).

As formas terapêuticas convencionais para Doença de Crohn, embora ajudem no alívio dos sintomas, são insatisfatórios para grande parte dos pacientes, por conta dos efeitos colaterais, alto custo dos medicamentos e difícil acesso, acabam apresentando riscos de não-adesão terapêutica entre os pacientes.

Pesquisas acerca de produtos naturais e suas aplicações no tratamento de diversas doenças inflamatórias como por exemplo a DII, estão cada vez mais em evidencia e a literatura enaltece os benefícios do extrato da alga *Cystoseira tamariscifolia* e seus efeitos farmacológicos promissores atribuídos a sua atividade biológica, que impactam diretamente na saúde da população acometidas de diversas enfermidades de grande repercussão social como: cânceres, úlceras gástricas e intestinais, diabetes, inflamações e infecções de grande espectro, geralmente levando esses portadores a grande morbidade ou mortalidade.

O uso de nanopartículas pela indústria farmacêutica tem aumentado, pois as vantagens da entrega de compostos mediada por elas mostram-se promissoras, atingem o acúmulo nos tecidos-alvo, por direcionamento passivo ou ativo auxiliando o fármaco nos seus efeitos biológicos, na sua aplicação e finalidades farmacológicas, proporcionando por consequência, agregação comercial e benefícios aos usuários em tratamentos.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

O objetivo geral deste projeto é avaliar o potencial biológico antiinflamatório e antioxidante das nanopartículas de ouro biossintetizado com extrato de alga *Cystoseira tamariscifolia* (Au@CT) no modelo experimental de Doença de Crohn (DC), sobre morfologia, atividade anti-inflamatória, antioxidante e atividade das células gliais do sistema nervoso entérico.

3.2. Objetivos específicos

1. Avaliar o efeito do protetor do extrato de alga *Cystoseira tamariscifolia* (CT) bem como das nanopartículas de ouro biossintetizado com extrato de alga *Cystoseira tamariscifolia* (Au@CT), no modelo experimental de DC, através de análises macroscópicas, morfométrica e histológicas do cólon dos animais;

2. Investigar o potencial antiinflamatório do extrato de alga *Cystoseira tamariscifolia* (CT) no modelo experimental de DC induzida pelo ácido acético, através da determinação dos níveis de mieloperoxidase e das citocinas pró-inflamatórias: interleucina I beta (IL-1 beta) e TNF alfa;

3. Investigar o potencial antioxidante do extrato de alga *Cystoseira tamariscifolia* (CT) no modelo experimental de DC induzida pelo ácido acético, através da determinação dos níveis de glutathiona reduzida (GSH), de malondialdeído (MDA) e atividade da mieloperoxidase (MPO);

4. Estudar a participação das células gliais do plexo mioentérico, como S100 beta e GFAP por imuno-histoquímica no modelo experimental de DC induzida por ácido acético à 8%.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Aspectos éticos

Os experimentos realizados seguiram rigorosamente as normas estabelecidas pelos princípios éticos da experimentação animal adotados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). O projeto foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) nº 6185090320, da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará (UFC).

4.2. Animais

Foram utilizados nos experimentos camundongos Swiss machos (*Mus musculus*) com massa corpórea entre 25 g e 30g, oriundos do Biotério Setorial do Departamento de Fisiologia e Farmacologia- UFC.

Durante o estudo, os animais foram mantidos no biotério do Núcleo de Estudos em Microscopia e Processamento de Imagem, os animais foram mantidos em gaiolas apropriadas, em número de seis ou oito, à temperatura de 22-24°C, em ciclo circadiano claro/escuro de 12 horas, recebendo ração padrão (Purina Chow) e água *ad libitum*. Os animais foram colocados em jejum de sólidos 16 horas antes da realização dos experimentos.

4.3. Drogas e Reagentes

Os fármacos, os reagentes e as soluções utilizadas neste estudo encontram-se detalhados no apêndice (APÊNDICE A).

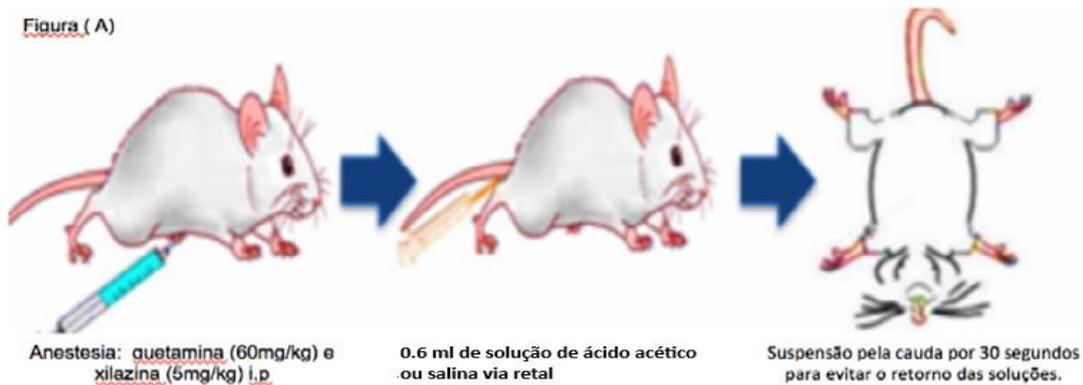
4.4. Obtenção do extrato da alga *Cystoseira tamariscifolia* (CT) e das nanopartículas de ouro biossintetizado com extrato de alga *Cystoseira tamariscifolia* (Au@CT)

O extrato aquoso liofilizado da alga *Cystoseira tamariscifolia* (CT) e das nanopartículas de ouro biossintetizado com extrato de alga *Cystoseira tamariscifolia* (Au@CT) foram cedidas pela pesquisadora responsável pela obtenção do produto, Dra. Andréa Ferreira de Castro Gomes, do Instituto de Ciência e inovação para Bio-Sustentabilidade (IB-S), Universidade do Minho, Departamento de Biologia, Campus de Gualtar, Braga, Portugal.

4.5. Modelo de Doença de Crohn (DC) experimental induzido pela administração do Ácido Acético (AA 8%) em camundongos

Inicialmente para a preparação do cólon os animais ficaram 12h em jejum e com água *ad libitum*. Para indução da DC, 8% ml do AA foi diluído em água destilada (100ml), sendo esta solução administrada num volume de 0,2ml por 10 gramas de peso animal. Os animais foram previamente anestesiados via intraperitoneal (IP) com uma mistura de cetamina (100mg/kg) e xilazina (20mg/kg) e posicionados em decúbito lateral esquerdo e introduzido, por via retal, um cateter de polietileno nº 6 medindo 4 cm de comprimento para a administração das soluções de AA 8% ou salina. Cada animal permaneceu suspenso pela cauda por 30 segundos para evitar o retorno das soluções (figura 8).

Figura 8- Modelo Experimental da Doença de Crohn Induzida por Ácido Acético.



Fonte: Adaptado de (CARNEIRO, 2019).

4.6. Grupos Experimentais

Os animais foram divididos em nove grupos experimentais, sendo cada grupo composto por dez animais, distribuídos da seguinte forma:

Grupo controle: Os animais foram submetidos ao modelo experimental de DC com administração de solução salina a 0.9% em um volume de 0,8mL por via retal, em substituição ao AA 8%;

Grupo colite: Os animais foram submetidos ao modelo experimental de DC com administração de ácido acético 8% (AA 8%), 0,8ml por via retal;

Grupo dexametasona: Os animais foram pré-tratados com dexametasona 0,2ml/30g, via intraperitoneal (IP), 1 horas antes da indução da DC por solução de AA 8%, 0,8ml por via retal;

Grupo CT (25 mg/kg): Os animais foram pré-tratados com extrato de CT, na dose de 25 mg/Kg, por via oral, 1 horas antes da indução da DC por solução de AA 8%, 0,8 ml por via retal;

Grupo CT (50 mg/kg): Os animais foram pré-tratados com extrato de CT, na dose de 50 mg/Kg, por via oral, 1 horas antes da indução da DC por solução de AA 8%, 0,8ml por via retal;

Grupo CT (100 mg/kg): Os animais foram pré-tratados com extrato de CT, na dose de 100 mg/Kg, por via oral, 1 horas antes da indução da DC por solução de AA 8%, 0,8ml por via retal;

Grupo Au@CT (25mg/kg): Os animais foram pré-tratados com Au@CT, na dose de 25 mg/Kg, por via oral, 1 horas antes da indução da DC por solução de AA 8%, 0,8ml por via retal;

Grupo Au@CT (50mg/kg): Os animais foram pré-tratados com Au@CT, na dose de 50 mg/Kg, por via oral, 1 horas antes da indução da DC por solução de AA 8%, 0,8ml por via retal;

Grupo Au@CT (100mg/kg): Os animais foram pré-tratados com Au@CT, na dose de 100 mg/Kg, por via oral, 1 horas antes da indução da DC por solução de AA 8%, 0,8ml por via retal.

4.7. Procedimentos de Eutanásia

12 horas após indução da colite, todos os animais do estudo foram submetidos à eutanásia, através de overdose de cetamina (300 mg/Kg) e xilazina (30 mg/Kg), ambos por via intraperitoneal, seguida de exsanguinação. Usando técnicas operatórias padronizadas, foi realizada laparotomia através de incisão mediana, dissecação e remoção de segmento colônico para estudo, tendo como limite proximal o cólon descendente a cerca de 6 cm da sínfise púbica e o limite distal com o reto, seccionado ao nível da reflexão peritoneal. As peças foram abertas longitudinalmente, lavadas com soro fisiológico e armazenadas para posterior avaliação macroscópica, histológica e bioquímica.

4.8. Avaliação Macroscópica

Após 12h da indução da colite, todos os animais do estudo foram submetidos à eutanásia, seguida de exsanguinação. Usando técnicas operatórias padronizadas, foi realizada laparotomia através de incisão mediana, dissecação e remoção de segmento colônico para avaliação macroscópica. As peças foram abertas longitudinalmente, lavadas com soro fisiológico e distendidas sobre uma superfície plana, sendo avaliadas por um pesquisador cego para os grupos do trabalho, que realizou uma análise macroscópica com a utilização de lupa estereoscópica e aplicou o escore de inflamação abaixo (tabela 4) (MORRIS et al., 1989):

Tabela 4- Escore de Inflamação Através de Análise Macroscópica com a Utilização de Lupa Estereoscópica.

CRITÉRIO	ESCORE
APARÊNCIA NORMAL	0
HIPEREMIA FOCAL, SEM ÚLCERA	1
ULCERAÇÃO SEM HIPEREMIA OU ESPESSAMENTO DA PAREDE COLÔNICA	2
ULCERAÇÃO COM INFLAMAÇÃO EM UMA REGIÃO	3
ULCERAÇÃO/INFLAMAÇÃO EM DUAS OU MAIS REGIÕES	4
LESÃO PRINCIPAL SE EXTENDENDO POR 1 CM AO LONGO DO CÓLON	5
QUANDO A LESÃO PRINCIPAL SE EXTENDE POR MAIS QUE 2 CM AO LONGO DO CÓLON, 1 PONTO É DADO PARA CADA CM ADICIONAL	6-10

4.9. Avaliação Microscópica

Na área que macroscopicamente apresentava o maior comprometimento inflamatório em cada cólon dissecado foi isolado um segmento de 1 cm, acondicionado em cassete e encaminhado para fixação em formol a 10%. Após 24 horas todos os cassetes foram mergulhados em álcool absoluto para desidratação. Após diafanização com xilol e inclusão com parafina, as lâminas foram preparadas e coradas com hematoxilina e eosina. As lâminas foram avaliadas por um pesquisador cego para os grupos do trabalho, que realizou uma análise microscópica e aplicou o escore de inflamação abaixo (tabela 5) (APPLEYARD; WALLACE, 1995):

Tabela 5- Escore de Inflamação por Análise Microscópica

CRITÉRIO	ESCORE
PERDA DE ARQUITETURA DA MUCOSA	0 – 3
INFILTRAÇÃO CELULAR	0 – 3
ESPESSAMENTO DA CAMADA MUSCULAR	0 – 3
FORMAÇÃO DE ABSCESSO EM CRIPTA	0 – 1
AUSÊNCIA DE CÉLULAS CALICIFORMES	0 – 1

4.10. Avaliação de Atividade da Mieloperoxidase (MPO)

Mieloperoxidase (MPO) é uma enzima presente, predominantemente, nos grânulos azurófilos dos neutrófilos e tem sido utilizada como um marcador quantitativo da infiltração de neutrófilos nos processos inflamatórios em vários tecidos. Resumidamente, 50 a 100 mg de cólon de cada animal foram colocados num tampão 1 (NaCl 0,1 M + NaEDTA 0,015 M/L de NaPO₄ 0,02 M em pH 4,7). Posteriormente, homogeneizados num Politron (13000 rpm). Sendo centrifugado a 15 minutos (3000 rpm). Logo em seguida, o sobrenadante foi retirado e o precipitado, novamente foi centrifugado no tampão 1 e colocado para centrifugar nas mesmas condições. O sobrenadante foi, mais uma vez, retirado e, então, o precipitado foi homogeneizado (Politron - 13000 rpm) em um tampão 2 (HTAB (0,05%) /200 ml de NaPO₄ 0,05 M). A próxima etapa foi colocar esse homogenato para congelar e descongelar em nitrogênio líquido (2 vezes). Posteriormente, o homogenato foi centrifugado a 10000-20000 rpm por 15 minutos. Finalmente, o sobrenadante foi pipetado na placa (5-10 µl) + 45 µl de NaPO₄ 0,08M e mais a solução de leitura [TMB 25 µl (5 min) + H₂O₂ 100 µl (5 min)]. A reação foi terminada com o acréscimo de H₂SO₄ 50 µl (4M) e lida em um leitor de placa a 450 nm. Assim, o infiltrado neutrofílico foi obtido a partir de uma curva padrão de neutrófilos. Os resultados são expressos como unidades de MPO por miligrama de tecido (CARVALHO et al., 2015).

4.11. Determinação dos Níveis de Glutathiona Reduzida (GSH)

A concentração de glutathiona reduzida (GSH) foi realizada de acordo com o método proposto por Sedlak e Lindsay (1968), que baseia-se na reação do DTNB [5,5 ditídio-bis-(ácido-2-nitrobenzóico)], com o tiol livre originando um dissulfeto misto mais ácido, o ácido 2-nitro-5-benzóico; para determinação de grupos sulfídricos não proteicos (NPSH). A determinação da GSH, foi feita em amostras de tecidos da mucosa intestinal correspondente ao íleo (100mg/mL) onde, após descongelamento, foram mantidas no eppendorf em um bécker com gelo e, posteriormente homogeneizada em um homogeneizador de tecidos (Polytron®) em 0,02M EDTA refrigerado, para consequente preparação de um homogenato a 10%. Alíquotas de 400 µl do homogenato foram adicionadas a 320 µl de água destilada e a 80 µl de ácido tricloroacético (TCA) a 50% para precipitação de proteínas. Em seguida o material foi centrifugado a 3.000 rpm por 15 minutos à 4°C. Após a centrifugação, 400 µl do

sobrenadante foi retirado e misturado a 800µl de tampão TRIS com concentração de 0,4 M (pH 8,9) e 20 µl de DTNB (reagente de Ellman) 0,01 M e agitadas por 3 minutos. A absorbância foi então mensurada a 412 nm em leitor de placa (Elisa®) contra um reagente branco (sem homogenato). A concentração foi expressa por µg de GSH/g de tecido a partir de uma curva padrão.

4.12. Determinação dos Níveis de Malondialdeído (MDA)

Malondialdeído é um dos principais produtos da cascata de peroxidação lipídica, utilizado para confirmar o dano oxidativo, determinado pela reação com ácido tiobarbitúrico (TBARS). Os níveis de MDA foram verificados pelo método de Mihara e Uchiyama (1978), para isso, amostras de 50 mg tecido da mucosa intestinal correspondentes ao íleo foram homogeneizadas em 500 µl de solução de KCl a 1,15%, refrigerado, obtendo-se um homogenato a 10%. Desta obtenção, alíquotas de 250 µl do homogenato foram adicionadas a tubos falcon plástico contendo 1,5 mL da solução de H₃PO₄ a 1% e 500 µL da solução de TBARS (0,6%). Em seguida, os tubos foram alinhados em estantes para tubo de ensaio, envolta em plástico filme e aquecidos em banho-maria a 100°C, por um período de 45 minutos, e então, resfriado em um banho de água gelada, seguida da adição de 2 mL de n-butanol. Em sequência, as amostras foram agitadas em vortex (Phoenix®) por um minuto, e posteriormente centrifugados (LEICA®) a 1200 rpm por 15 minutos. O sobrenadante, fase orgânica, foi mensurado a uma absorbância de 520 e 535 nm, em leitor de placa (ELISA®), sendo o resultado obtido pela diferença da absorbância das duas leituras. Os resultados foram expressos em nmol/g de tecido intestinal.

4.13- Determinação dos Níveis das Citocinas IL-1beta e TNF-α

Os níveis da citocina pró-inflamatória IL-1beta na mucosa intestinal foi quantificada por ELISA. Para a dosagem de IL-1 beta e TNF-alfa, foi utilizado a melhor dose de EACP (3 mg/kg). Os tecidos coletados foram homogeneizados em PBS. A detecção da citocina IL-1 beta foi realizada por meio do Kit DuoSet (R&D Systems, EUA). Resumidamente, as placas para ELISA de 96 poços foram incubadas com o anticorpo de captura para IL-1beta por 18h em temperatura ambiente com 100µL de anticorpo para cada poço. Posteriormente, as placas foram lavadas três vezes com 200µL de tampão de lavagem (R&D Systems, EUA) e bloqueadas com 200µL de BSA 1% (R&D Systems, EUA) por 1 h. Após o bloqueio, 100µL das amostras ou da curva

padrão foram adicionadas em cada poço e incubadas por 2 h em temperatura ambiente. As placas foram então lavadas três vezes com 200µl de tampão de lavagem e depois incubadas com anticorpo de detecção para IL-1beta em temperatura ambiente por 2 horas. Na etapa seguinte, as placas foram lavadas novamente por três vezes com 200µL de tampão de lavagem e incubadas com 100 µL de estreptavidina em temperatura ambiente por 20 minutos. Novamente, as placas foram lavadas três vezes com 200µL de tampão de lavagem. Na etapa seguinte, 100 µL da solução substrato para revelação (R&D Systems, EUA) foram adicionadas em cada poço e incubadas por 20 min à temperatura ambiente protegidos da luz. A reação enzimática foi cessada, adicionando 50 µL solução de parada (H₂SO₄). Enfim, a absorbância foi medida à 450nm. O resultado foi expresso em pg/mL.

4.14 Imuno-Histoquímica para S 100beta e GFAP

Para avaliar a localização do marcador inflamatório S100beta e GFAP na mucosa intestinal foi realizado imuno-histoquímica para esse imunomarcador. Após a retirada dos segmentos do cólon, os mesmos foram isolados, separados e fixados em formol tamponado a 10% por 20 horas. Os tecidos foram processados para inclusão em parafina. Após a inclusão em parafina, os segmentos do cólon foram cortados em micrótomo, obtendo-se espessuras de 4µm que foram inseridos em lâminas histológicas salinizadas.

Na etapa seguinte, as lâminas contendo os cólons foram submetidas à desparafinização: inseridas em estufa a 60°C overnight e três banhos em xilol por cinco minutos cada. Em seguida, os cólons foram hidratados com dois banhos de etanol absoluto, um banho em etanol a 90%, um banho em etanol a 80% e um banho em etanol a 70%, por três minutos cada. Ao final dessa etapa, os cortes intestinais foram submersos a um banho de água destilada por 10 minutos e foi realizada a recuperação antigênica com tampão citrato (DAKO, pH 7,0) por 20 min em banho maria (95oC). Em seguida, os tecidos foram lavados com tampão fosfato-salino (PBS) por 5 minutos. Na etapa seguinte, realizou-se o bloqueio da peroxidase com peróxido de hidrogênio a 3% (Abcam) por 30 minutos. Decorrido este tempo, as lâminas foram lavadas com PBS e foram incubadas com os anticorpos primários para S100beta e GFAP por 1h em temperatura ambiente. Para confecção dos controles negativos, os

anticorpos primários foram omitidos. Após este período, os cortes foram lavados três vezes com PBS e incubados com polímero (DAKO) por 30 min. Em seguida, as lâminas foram lavadas três vezes com PBS durante três minutos cada, secadas e aplicado o DAB (DAKO, 3,3-diaminobenzidina, uma gota de DAB para um mL de diluente). DAB é um cromógeno que reage com a peroxidase do antígeno alvo resultando em coloração marrom. Dessa forma, observou-se as lâminas até aparecer uma coloração marrom, após este evento a reação foi parada imediatamente mergulhando-as em água destilada. Enfim, as lâminas foram contra coradas com hematoxilina de Mayer e processadas para inserir a lamínula. As imagens da imunohistoquímica foram capturadas (oito campos por lâmina para cada animal) por meio de um microscópio de luz acoplado a uma câmera com sistema de aquisição LAZ 3,5 (LEICA DM1000, Alemanha). Para quantificar o número de células positivas para S100beta e GFAP, utilizou-se o programa Image J. Os resultados foram expressos em média \pm EPM do número de células positivas para GFAP ou S100 beta por campo.

4.15. Análise Estatística

Todos os resultados quantitativos foram expressos como média \pm desvio padrão da média (DPM), exceto os escores histopatológicos que foram expressos pela mediana. A análise estatística dos dados foi realizada por meio do software GraphPad Prism®, versão 5.0. Para a realização da análise estatística entre os grupos serão utilizados os seguintes testes: teste de análise de variância (ANOVA) seguido pelo teste de comparações múltiplas de Bonferroni e para os escores histológicos foi realizado teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn. O nível de significância adotado foi de 5% ($p < 0,05$) e níveis descritivos (p) inferiores a esse valor foram considerados significantes.

5.0 RESULTADOS

5.1. Avaliação macroscópica do cólon de camundongos pré-tratados com o extrato da alga *C. tamariscifolia* (CT) no modelo de colite experimental por ácido acético 8% (AA 8%)

Houve um aumento significativo dos escores macroscópicos de atividade inflamatória no grupo Colite, 12 horas após a indução da colite pelo AA 8%, quando comparados com os grupos controle e dexametasona, conforme pode ser observado na figura 9 e na tabela 6. Com base na avaliação, as doses de 25 e 50 mg/Kg, dos grupos CT, foram capazes de diminuir, significativamente, os aspectos inflamatórios totais, quando comparado ao grupo colite. Não houve diferença entre os escores dos grupos CT 100 mg/Kg em relação ao grupo colite.

Na figura 10 é possível observar aspectos inflamatórios como: úlcera, hiperemia, edema e prolapso do cólon em animais do grupo colite (painel B) e CT 100mg/Kg (painel F) quando comparado ao grupo controle (painel A). O pré-tratamento com dexametasona (painel C) ou CT nas doses de 25 e 50 mg/Kg (painel D e E, respectivamente), foram capazes de prevenir os aspectos inflamatórios citados anteriormente.

Figura 9 – Avaliação macroscópica de atividade inflamatória (escore total) do cólon de camundongos tratados com o extrato da alga *C. tamariscifolia* (CT) no modelo de colite experimental por ácido acético 8% (AA 8%), segundo os critérios de Morris e colaboradores (1989). As colunas representam a média \pm EPM dos escores macroscópicos totais, analisados pelo teste One-way ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni. ^a $p < 0,05$ versus grupo Controle; ^b $p < 0,05$ versus grupo Ácido acético 8%.

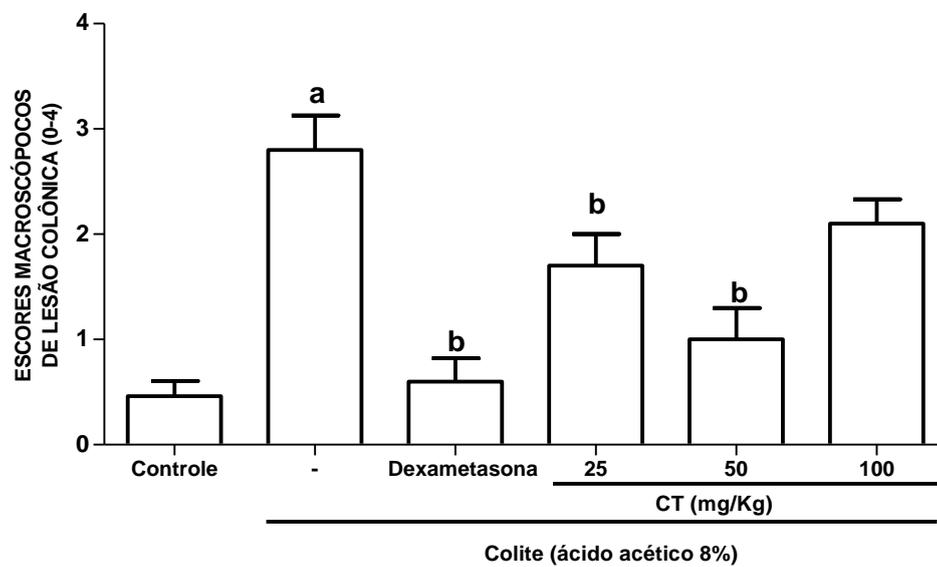
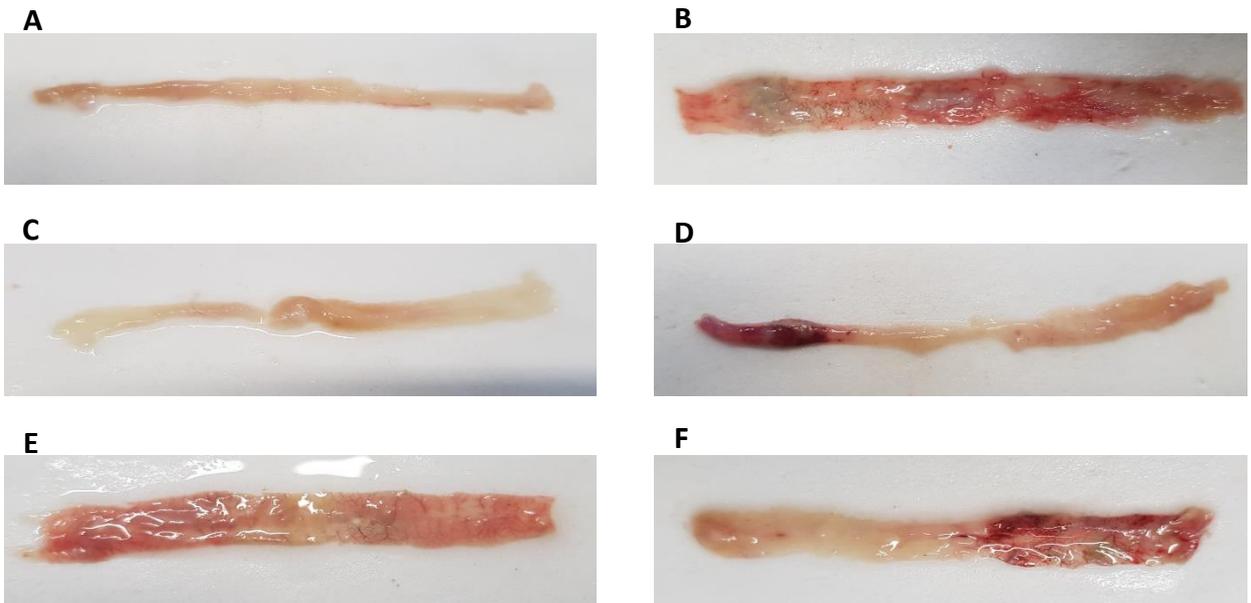


Tabela 6 – Efeito da *C. tamariscifolia* (CT) sobre os escores macroscópicos totais de inflamação no cólon de camundongos com colite induzida pelo Ácido acético 8% (AA 8%). Os resultados são expressos como: mediana, mínimo e máximo mostrados nos parênteses. Os dados foram analisados pelo teste de Kruskal– Wallis. ^ap< 0,05 versus Grupo Controle; ^bp< 0,05 versus Grupo Colite, onde o grupo controle apresentou escore 0; Ácido Acético 8% apresentou escore 3; Dexametasona apresentou escore 0.5; CT 25 mg/Kg apresentou escore 1; CT 50mg/Kg apresentou escore 1 e o grupo CT 100mg/Kg apresentou escore 2.

GRUPOS EXPERIMENTAIS	ESCORES MACROSCÓPICOS
Controle	0 (0-1)
Ácido Acético 8%	3 (1-4) ^a
Dexametasona	0,5 (0-2) ^b
CT 25 mg/Kg	1 (0-3) ^b
CT 50mg/Kg	1 (0-3) ^b
CT 100mg/Kg	2 (1-3)

Figura 10 – Fotografias mostrando o aspecto macroscópico do cólon de camundongos tratados com o extrato da alga *C. tamariscifolia* (CT) no modelo de colite experimental por ácido acético 8% (AA 8%): (A) Grupo controle, (B) Grupo colite, (C) Grupo dexametasona, (D) Grupo CT 25 mg/Kg, (E) Grupo CT 50 mg/Kg e (F) Grupo CT 100 mg/Kg.



Fonte: próprio autor.

5.2. Avaliação macroscópica das lesões no cólon de camundongos pré-tratados com nanopartículas de ouro biossintetizado com o extrato da alga *C. tamariscifolia* (Au@CT) no modelo de colite experimental por ácido acético 8% (AA 8%)

De acordo com escores macroscópicos observados, o pré-tratamento com Au@CT protegeu o cólon de lesões induzidas pelo AA 8%, nas doses de 25 e 50 mg/Kg, quando comparado com o grupo colite. Resultado este semelhante ao observado com a droga padrão dexametasona. Não houve diferença significativa entre o grupo CT 100 mg/kg, em relação ao grupo Colite (figura 11 e tabela 7).

O pré-tratamento, com Dexametasona (painel C) ou Au@CT, nas doses de 25 e 50 mg/kg, foram capazes de prevenir os aspectos inflamatórios como: úlcera, hiperemia, edema e prolapso do cólon, quando comparado ao grupo Colite (painel B). Au@CT 100 mg/Kg (painel F), não apresentou efeito semelhante as doses de 25 e 50 mg/Kg (figura 12).

Figura 11 – Avaliação macroscópica de atividade inflamatória (escore total) do cólon de camundongos tratados com nanopartículas de ouro bio-sintetizado com o extrato da alga *C. Tamariscifolia* (Au@CT) no modelo de colite experimental por ácido acético 8% (AA 8%), segundo os critérios de Morris e colaboradores (1989). As colunas representam a média \pm EPM dos escores macroscópicos totais, analisados pelo teste One-way ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni. ^ap < 0,05 versus grupo Controle; ^bp < 0,05 versus grupo Ácido acético 8%.

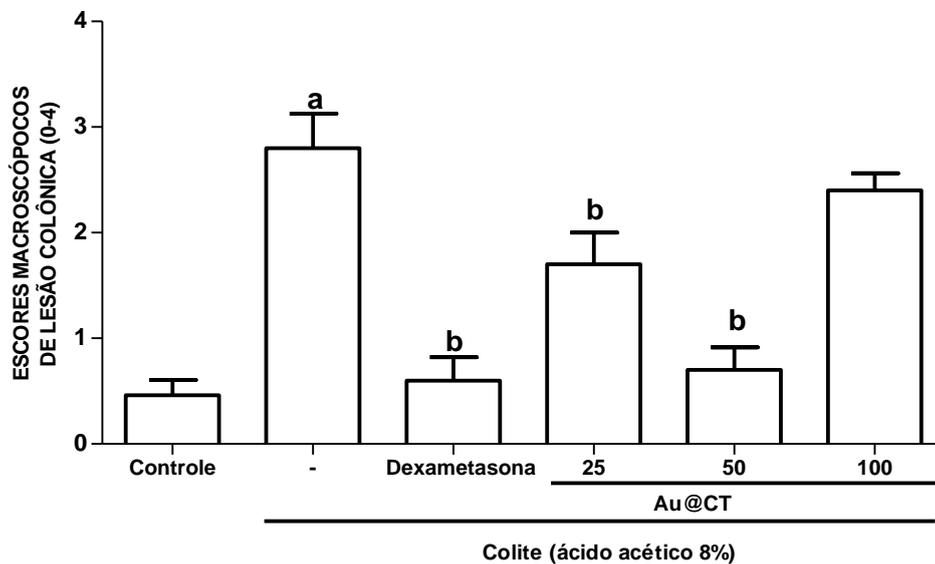
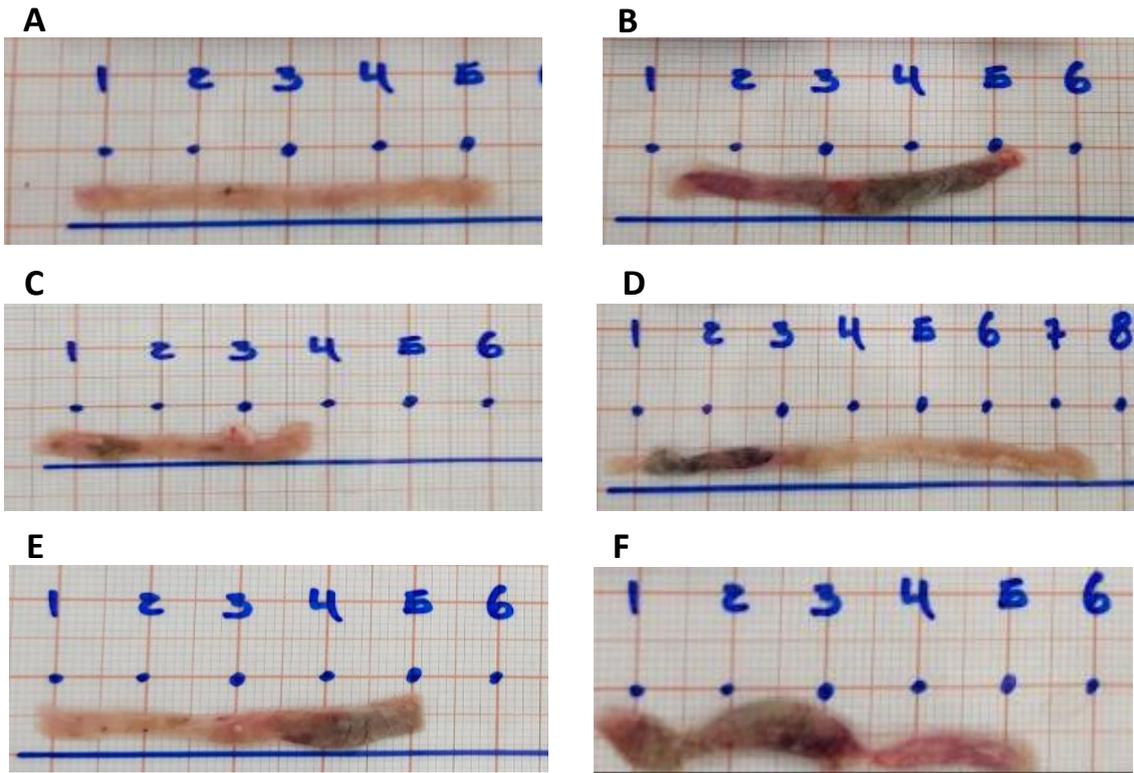


Tabela 7 – Efeito das nanopartículas de ouro biossintetizado com o extrato da alga *C. tamariscifolia* (Au@CT) sobre os escores macroscópicos totais de inflamação no cólon de camundongos com colite induzida pelo Ácido acético 8% (AA 8%). Os resultados são expressos como: mediana, mínimo e máximo mostrados nos parênteses. Os dados foram analisados pelo teste de Kruskal–Wallis. ^ap< 0,05 versus Grupo Controle; ^bp< 0,05 versus Grupo Colite, onde o grupo controle apresentou escore 0; o grupo Ácido Acético 8% apresentou escore 3; Dexametasona apresentou escore 0.5; Au@CT 25 mg/Kg apresentou escore 2; Au@CT 50 mg/Kg apresentou escore 1 e o grupo Au@CT 100 mg/Kg apresentou escore 2.

GRUPOS EXPERIMENTAIS	ESCORES MACROSCÓPICOS
Controle	0 (0-1)
Ácido Acético 8%	3 (1-4) ^a
Dexametasona	0,5 (0-2) ^b
Au@CT 25 mg/Kg	2 (0-3) ^b
Au@CT 50 mg/Kg	1 (0-2) ^b
Au@CT 100 mg/Kg	2 (2-3)

Figura 12 – Fotografias mostrando o aspecto macroscópico do cólon de camundongos tratados com nanopartículas de ouro biossintetizado com o extrato da alga *C. tamariscifolia* (Au@CT) no modelo de colite experimental por ácido acético 8% (AA 8%): (A) Grupo controle, (B) Grupo colite, (C) Grupo dexametasona, (D) Grupo Au@CT 25 mg/Kg, (E) Grupo Au@CT 50 mg/Kg e (F) Grupo Au@CT 100 mg/Kg.



Fonte: próprio autor.

5.3. Avaliação microscópica do cólon de camundongos pré-tratados o extrato da alga *C. tamariscifolia* (CT) no modelo de colite experimental por ácido acético 8% (AA 8%)

Na análise microscópica por escores totais de inflamação, segundo os critérios de Appleyard; Wallace, 1995, observou-se que o AA 8% promoveram alterações microscópicas importantes como: lesão hemorrágica, edema, perda de arquitetura e infiltração de células inflamatórias no cólon dos animais estudados, quando comparado com o grupo controle. O pré-tratamento, por via oral, com CT na dose de 50 mg/kg, diminuiu ($p < 0,05$) os escores microscópicos citados anteriormente. Resultados semelhantes foram observados no grupo dexametasona (figura 13 e tabela 8).

A figura 14 ilustra o resultado da avaliação microscópica, evidenciando o processo inflamatório intenso nos animais do grupo Colite (AA 8%), com a presença de infiltrado celular, perda da arquitetura da mucosa, hemorragia e depleção de células caliciformes (painel B), quando comparado ao grupo controle (painel A). No grupo Controle (painel A) e grupo Dexametasona (painel C) observa-se um aspecto colônico normal. Uma melhora dos aspectos inflamatórios induzido pelo AA 8% foi observado nos animais pré-tratados com 50 mg/kg de CT, por via oral (painel E). Os grupos CT 25 e 100 mg/Kg não preveniram o efeito lesivo do AA 8%, apresentando um padrão inflamatório semelhante aos animais com colite (painel D e F, respectivamente).

Figura 13 – Avaliação microscópica de atividade inflamatória (escore total), segundo os critérios de Appleyard; Wallace, 1995. As colunas representam a média \pm EPM, dos escores microscópicos, analisados pelo teste One-way ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni. ^a $p < 0,05$ versus grupo Controle; ^b $p < 0,05$ versus grupo Ácido acético 8%.

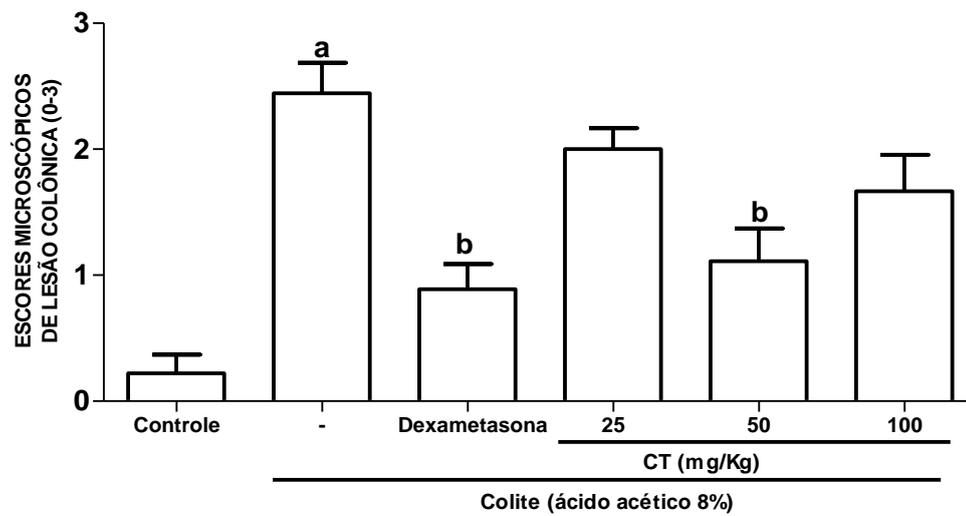
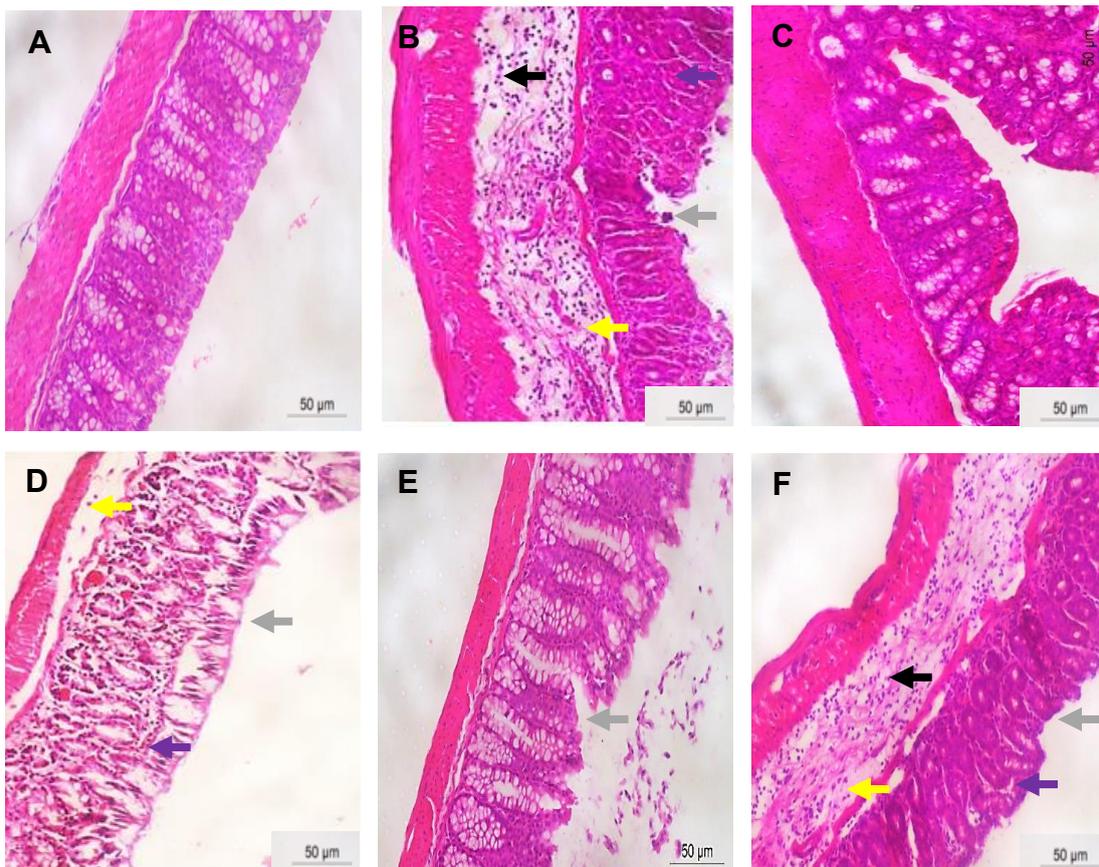


Tabela 8 – Efeito do extrato da alga *C. tamariscifolia* (CT) sobre os escores microscópicos de inflamação no cólon de camundongos com colite induzida pelo Ácido acético 8% (AA 8%), segundo os critérios de Appleyard; Wallace, 1995. Os resultados são expressos como: mediana, mínimo e máximo mostrados nos parênteses. Os dados foram analisados pelo teste de Kruskal– Wallis. ^ap< 0,05 versus Grupo Controle; ^bp< 0,05 versus Grupo Ácido Acético 8% onde o grupo controle apresentou escore 0; o grupo ácido acético 8% apresentou escore 3; o grupo dexametasona apresentou escore 1; o grupo CT25 mg/Kg apresentou escore 2; o grupo CT 50 mg/Kg apresentou escore 1 e o grupo CT100 mg/Kg apresentou escore 2.

GRUPOS EXPERIMENTAIS	ESCORES MICROSCÓPICOS (Appleyard; Wallace, 1995)
Controle	0 (0-1)
Ácido Acético 8%	3 (1-3) ^a
Dexametasona	1 (0-2) ^b
CT25 mg/Kg	2 (1-3)
CT 50 mg/Kg	1 (0-2) ^b
CT100 mg/Kg	2 (0-3)

Figura 14 – Fotomicrografias do cólon de camundongos tratados com o extrato da alga *C. tamariscifolia* (CT) no modelo de colite experimental por ácido acético 8% (AA 8%). Magnificação de 50x, coloração: hematoxilina e eosina. (A) Grupo controle, (B) Grupo colite, (C) Grupo dexametasona, (D) Grupo CT 25 mg/Kg, (E) Grupo CT 50 mg/Kg e (F) Grupo CT 100 mg/Kg.



Legenda:

- perda da arquitetura de mucosa;
- espessamento (edema);
- infiltrado celular inflamatório,
- ausência de células caliciformes.

5.4. Avaliação microscópica das lesões no cólon de camundongos pré tratados com nanopartículas de ouro biossintetizado com *C.tamariscifolia* (Au@CT) no modelo de colite experimental por ácido acético 8% (AA 8%)

Como observado na figura 15 e tabela 09, o AA 8% promoveram alterações microscópicas importantes como: lesão hemorrágica, edema, perda de arquitetura e infiltração de células inflamatórias no cólon dos animais estudados, quando comparado com o grupo controle. O pré-tratamento, por via oral, com Au@CT nas doses de 25 e 50 mg/kg, diminuiu ($p < 0,05$) os escores microscópicos. Dados estes semelhantes aos observados no grupo dexametasona. Não foi observado diferença estatística na dose de 100 mg/kg, quando comparado ao grupo colite.

A figura 16 ilustra o resultado da avaliação microscópica, evidenciando o processo inflamatório intenso nos animais do grupo colite (AA 8%), com a presença de infiltrado celular, perda da arquitetura da mucosa, hemorragia e depleção de células caliciformes (painel B), quando comparado ao grupo controle (painel A). No grupo controle (painel A) e grupo dexametasona (painel C) observa-se um aspecto colônico normal. Uma melhora dos aspectos inflamatórios induzido pelo AA 8% foram observados nos animais pré-tratados com 25 e 50 mg/kg de Au@CT, por via oral (painel D e E, respectivamente). O grupo Au@CT 100 mg/Kg não preveniram as alterações microscópicas do AA 8%, apresentando um padrão inflamatório no colón semelhante aos animais com colite.

Figura 15 – Avaliação microscópica de atividade inflamatória (escore total), segundo os critérios de Appleyard; Wallace, 1995. As colunas representam a média \pm EPM, dos escores microscópicos, analisados pelo teste One-way ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni. ^a $p < 0,05$ versus grupo Controle; ^b $p < 0,05$ versus grupo Ácido acético 8%.

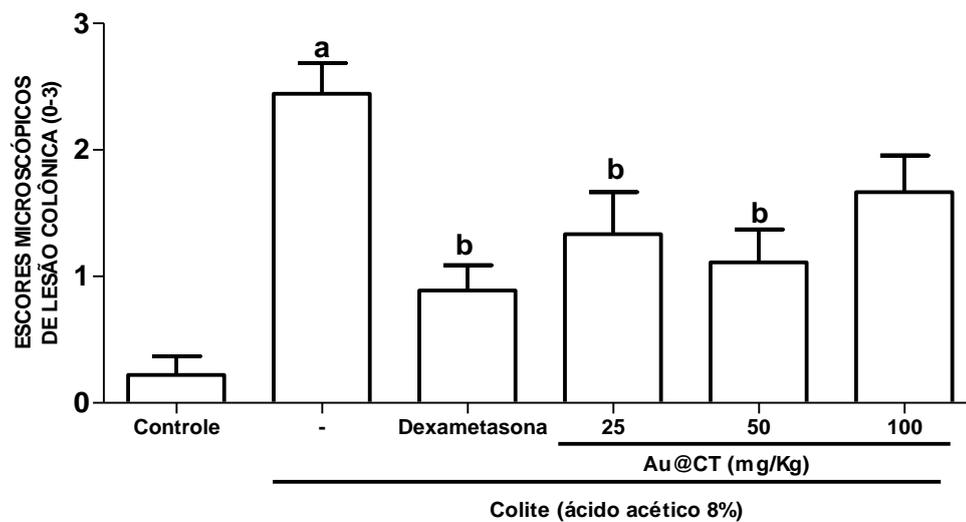
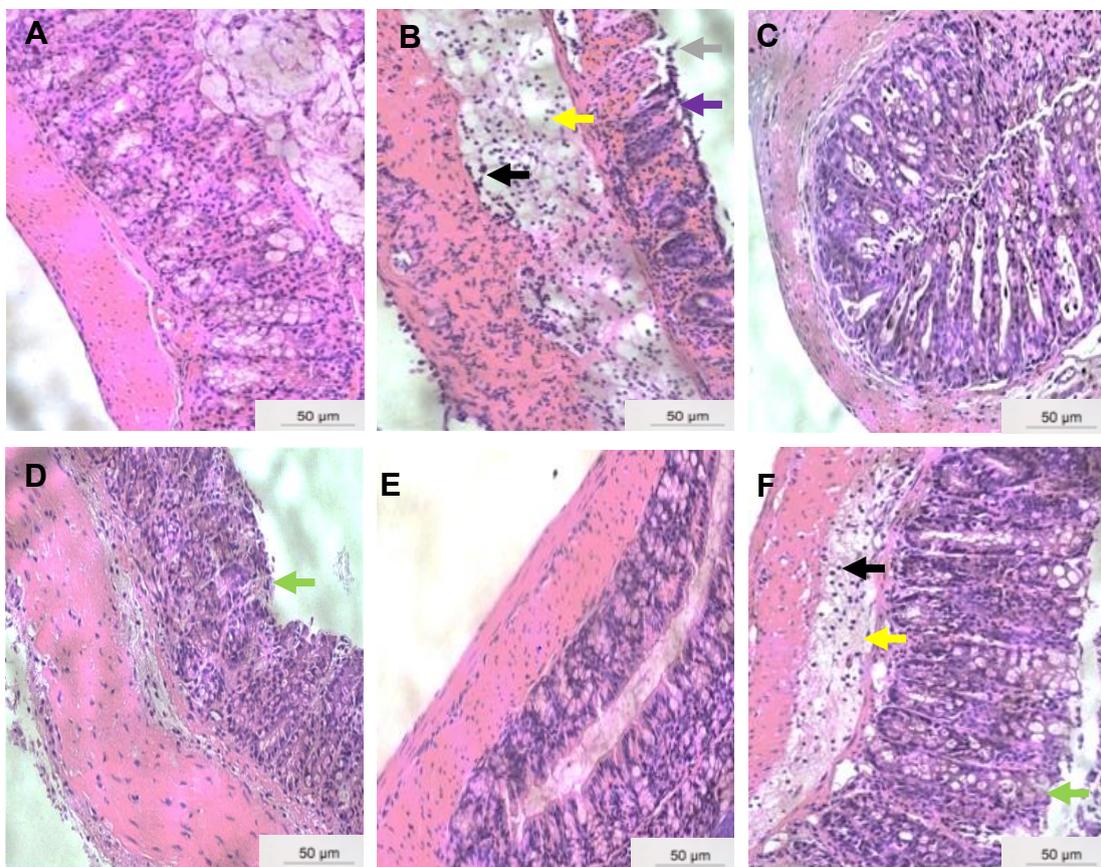


Tabela 09 – Efeito das nanopartículas de ouro bio-sintetizado com *C. tamariscifolia* (Au@CT) sobre os escores microscópicos de inflamação no cólon de camundongos com colite induzida pelo Ácido acético 8% (AA 8%), segundo os critérios de Appleyard; Wallace, 1995. Os resultados são expressos como: mediana, mínimo e máximo mostrados nos parênteses. Os dados foram analisados pelo teste de Kruskal– Wallis. ^ap< 0,05 versus Grupo Controle; ^bp< 0,05 versus Grupo Ácido Acético 8%, onde o grupo controle apresentou escore 0; Ácido Acético 8% apresentou escore 3; dexametasona apresentou escore 1; Au@CT 25mg/Kg apresentou escore 1; Au@CT 50mg/Kg apresentou escore 1; Au@CT 100mg/Kg apresentou escore 2.

GRUPOS EXPERIMENTAIS	ESCORES MICROSCÓPICOS (Appleyard; Wallace, 1995)
Controle	0 (0-1)
Ácido Acético 8%	3 (1-3) ^a
Dexametasona	1 (0-2) ^b
Au@CT 25mg/Kg	1 (0-3) ^b
Au@CT 50mg/Kg	1 (0-2) ^b
Au@CT 100mg/Kg	2 (0-3)

Figura 16 – Fotomicrografias do cólon de camundongos tratados com nanopartículas de ouro biossintetizado com *C. tamariscifolia* (Au@CT) no modelo de colite experimental por ácido acético 8% (AA 8%). Magnificação de 50x, coloração: hematoxilina e eosina. (A) Grupo controle, (B) Grupo colite, (C) Grupo dexametasona, (D) Grupo Au@CT 25 mg/Kg, (E) Grupo Au@CT 50 mg/Kg e (F) Grupo Au@CT 100 mg/Kg.



Fonte: próprio autor.

Legenda:
→ perda da arquitetura de mucosa;
→ espessamento (edema);
→ infiltrado celular inflamatório,
→ ausência de células caliciformes.

5.5. Determinação dos níveis de glutathiona reduzida (GSH) no cólon de camundongos pré-tratados com o extrato da alga *C. tamariscifolia* (CT) (painel A) e pré-tratados com nanopartículas de ouro biossintetizado com *C. tamariscifolia* (Au@CT) (painel B) no modelo de colite experimental por ácido acético 8% (AA 8%)

A concentração dos níveis de glutathiona reduzida, em mg de NPSH/g de tecido, no cólon de camundongos após a administração de AA 8% diminuiu de forma significativa ($28,24 \pm 5,9$), quando comparado com o grupo controle ($58,92 \pm 6,9$). O pré-tratamento com CT, na dose de 50 mg/kg ($53,34 \pm 2,1$), e dexametasona ($55,86 \pm 4,5$) se mostraram eficazes, restaurando os valores da glutathiona reduzida ao nível do grupo controle. As doses de 25 ($34,04 \pm 4,4$) e 100 ($31,22 \pm 2,8$) mg/kg de CT não evitaram a depleção dos níveis de glutathiona provocada pela colite por AA 8% (figura 17, painel A e tabela 10). O pré-tratamento com Au@CT restauraram os níveis de GSH, nas doses de 25 ($50,29 \pm 4,1$) e 50 ($55,55 \pm 3,8$) mg/kg, quando comparado ao grupo colite AA 8%. O mesmo resultado foi observado no grupo tratado com e dexametasona ($55,86 \pm 4,5$). Au@CT na dose de 100 ($40,67 \pm 6,1$) mg/kg não evitou a depleção dos níveis de glutathiona provocada pela colite por AA 8% (figura 17, painel B e tabela 11).

Figura 17- Efeito do extrato da alga da *C. tamariscifolia* (CT, painel A) e das nanopartículas de ouro biossintetizado com *C. tamariscifolia* (Au@CT, painel B) sobre os níveis de glutathiona reduzida (GSH) no cólon de camundongos submetidos ao modelo de colite experimental por ácido acético 8% (AA 8%). As colunas representam a média \pm EPM dos níveis de GSH, expressos em mg de NPSH/g de tecido. Os dados foram analisados pelo teste One-way ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni. ^ap < 0,05 versus grupo Controle; ^bp < 0,05 versus grupo Colite (Ácido acético 8%).

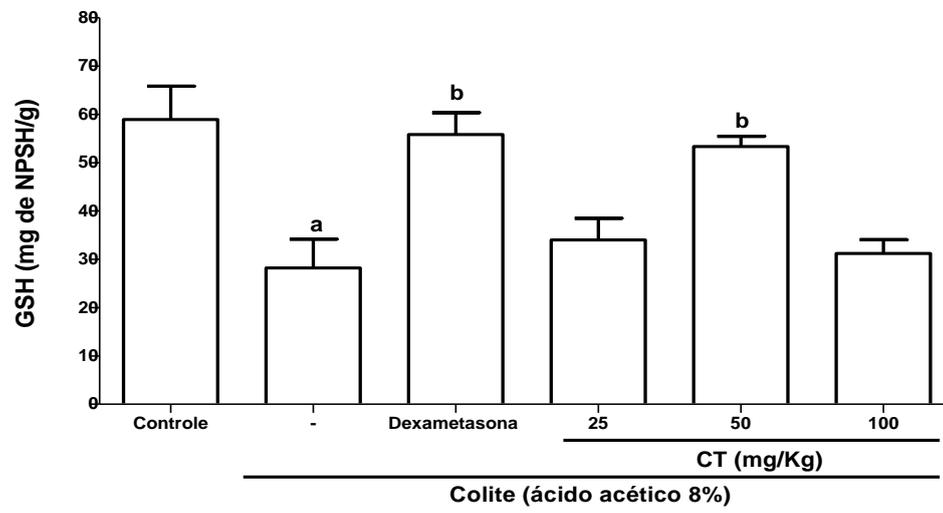
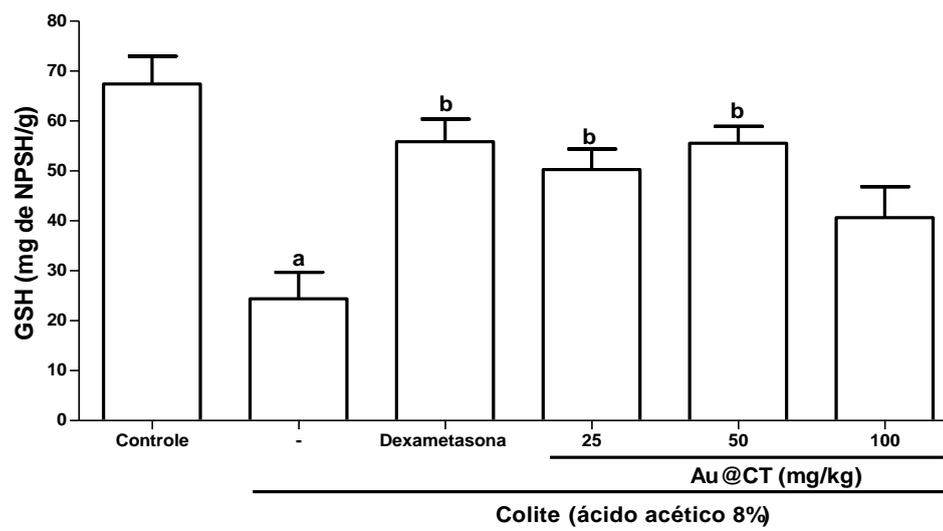
A**B**

Tabela 10 – Efeito do extrato da alga da *C. tamariscifolia* (CT) sobre os níveis de glutathiona reduzida (GSH) no cólon de camundongos submetidos ao modelo de colite experimental por ácido acético 8% (AA 8%). A tabela apresenta os resultados expressos em média \pm EPM dos níveis de GSH, em mg de NPSH/g de tecido. Os dados foram analisados pelo teste One-way ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni. ^ap < 0,05 versus grupo Controle; ^bp < 0,05 versus grupo Colite (Ácido acético 8%), onde o grupo controle apresentou (58,92 \pm 6,9 NPSH/g); Ácido Acético 8% (28,24 \pm 5,9^a NPSH/g); Dexametasona (55,86 \pm 4,5^b NPSH/g); CT 25mg/Kg (34,04 \pm 4,4 NPSH/g); CT 50mg/Kg (53,34 \pm 2,1^b NPSH/g); CT 100mg/Kg (31,22 \pm 2,8 NPSH/g).

GRUPOS EXPERIMENTAIS	NPSH/g de tecido (média \pm EPM)
Controle	58,92 \pm 6,9
Ácido Acético 8%	28,24 \pm 5,9 ^a
Dexametasona	55,86 \pm 4,5 ^b
CT 25mg/Kg	34,04 \pm 4,4
CT 50mg/Kg	53,34 \pm 2,1 ^b
CT 100mg/Kg	31,22 \pm 2,8

Tabela 11 – Efeito das nanopartículas de ouro biossintetizado com *C. tamariscifolia* (Au@CT) sobre os níveis de glutathiona reduzida (GSH) no cólon de camundongos submetidos ao modelo de colite experimental por ácido acético 8% (AA 8%). A tabela apresenta os resultados expressos em média \pm EPM dos níveis de GSH, em mg de NPSH/g de tecido. Os dados foram analisados pelo teste One-way ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni. ^ap < 0,05 versus grupo Controle; ^bp < 0,05 versus grupo Colite (Ácido acético 8%), onde o grupo controle apresentou (67,44 \pm 5,5 NPSH/g); Ácido Acético 8% (24,38 \pm 5,3^a NPSH/g); Dexametasona (55,86 \pm 4,5^b NPSH/g); Au@CT 25mg/Kg (50,29 \pm 4,1^b NPSH/g); Au@CT 50mg/Kg (55,55 \pm 3,8^b NPSH/g); Au@CT 100mg/Kg (40,67 \pm 6,1 NPSH/g).

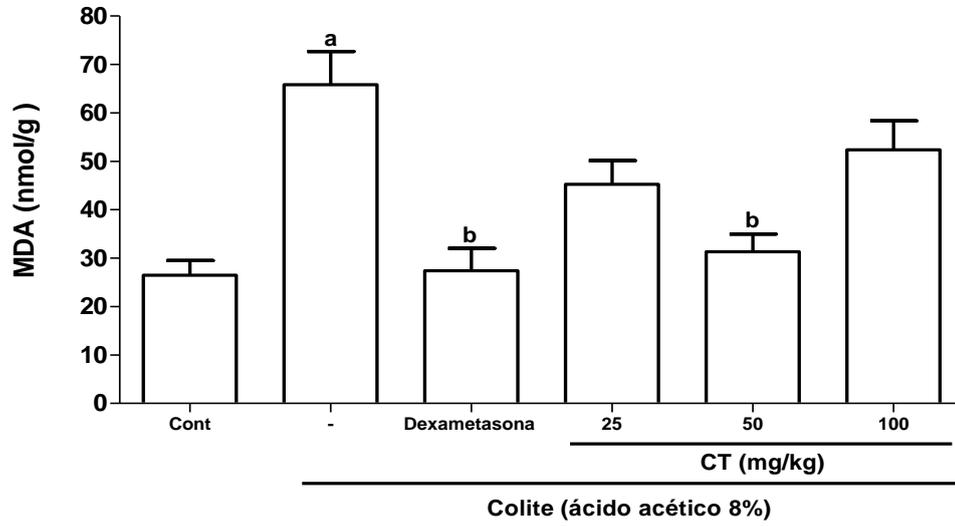
GRUPOS EXPERIMENTAIS	NPSH/g de tecido (média \pm EPM)
Controle	67,44 \pm 5,5
Ácido Acético 8%	24,38 \pm 5,3 ^a
Dexametasona	55,86 \pm 4,5 ^b
Au@CT 25mg/Kg	50,29 \pm 4,1 ^b
Au@CT 50mg/Kg	55,55 \pm 3,8 ^b
Au@CT 100mg/Kg	40,67 \pm 6,1

5.6 Determinação dos níveis de malondialdeído (MDA) no cólon de camundongos pré-tratados com o extrato da alga *C. tamariscifolia* (CT, painel A) e pré-tratados com nanopartículas de ouro biossintetizado com *C. tamariscifolia* (Au@CT, painel B) no modelo de colite experimental por ácido acético 8% (AA 8%)

Na figura 18 (painel A) e tabela 12 podemos observar que a colite por AA 8% aumentaram ($1715 \pm 239,4$) nos níveis de MDA (nMol/g de tecido), quando comparado ao grupo controle ($910 \pm 101,4$), indicando um processo severo de peroxidação lipídica por espécies reativas de oxigênio (ROS). CT mostrou ter um papel antioxidante importante no modelo de colite experimental estudado, principalmente na dose de 50 mg/kg ($1024 \pm 115,1$), onde observamos uma redução significativa nos níveis de MDA, quando comparado ao grupo colite AA 8%. Dados semelhantes foram observados no grupo Dexametasona ($1110 \pm 49,19$), quando comparado ao grupo colite AA 8%. Contudo, as doses de 25 ($1380 \pm 123,8$) e 100 ($1320 \pm 125,4$) mg/kg da *C. tamariscifolia* não reverteu a aumento da peroxidação lipídica induzida por AA 8%. Na figura 18 (painel B) e tabela 13, Au@CT nas doses de 25 e 50 mg/Kg foram capazes de evitar a peroxidação lipídica induzida pelo AA 8%, de forma significativa. Dados semelhantes foram observados no grupo Dexametasona ($1110 \pm 49,19$). Grupo Au@CT na dose de 100 mg/Kg apresentou altos níveis de MDA, quando comparado as doses de 25 e 50 mg/Kg.

Figura 18- Efeito do extrato da alga *C. tamariscifolia* (CT, painel A) e das nanopartículas de ouro biossintetizado com *C. tamariscifolia* (Au@CT, painel B) sobre os níveis de malondialdeído (MDA) no cólon de camundongos submetidos ao modelo de colite experimental por ácido acético 8% (AA 8%). As colunas representam a média \pm EPM dos níveis de MDA, expressos em nMol/g de tecido. Os dados foram analisados pelo teste One-way ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni. ^ap < 0,05 versus grupo Controle; ^bp < 0,05 versus grupo Ácido acético 8%.

A



B

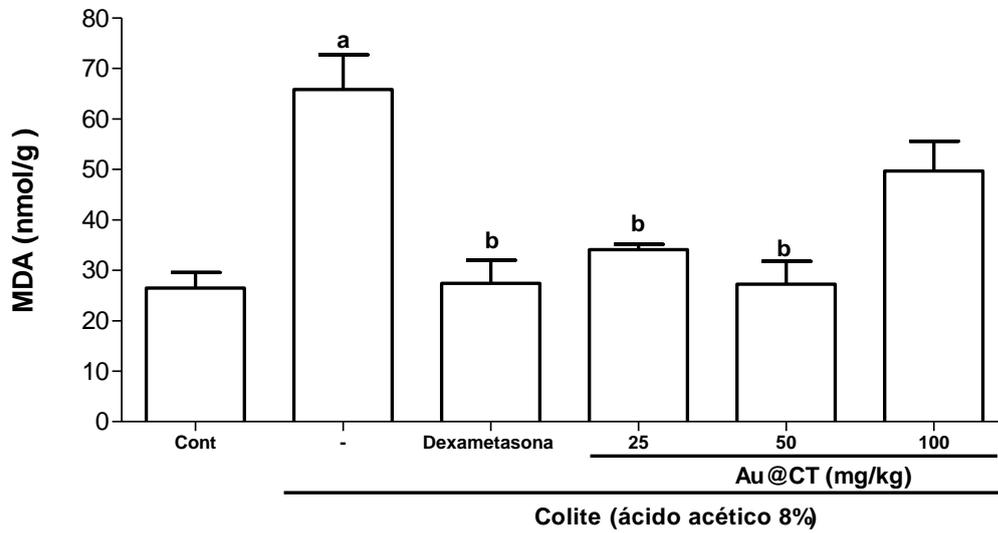


Tabela 12 – Efeito do extrato da alga *C. tamariscifolia* (CT) sobre os níveis de malondialdéido (MDA) no cólon de camundongos submetidos ao modelo de colite experimental por ácido acético 8% (AA 8%). A tabela apresenta os resultados expressos em média \pm EPM dos níveis de MDA, em nMol/g de tecido. Os dados foram analisados pelo teste One-way ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni. ^ap < 0,05 versus grupo Controle; ^bp < 0,05 versus grupo Colite (Ácido acético 8%), onde o grupo controle apresentou (26,48 \pm 3,0 nMol/g); Ácido Acético 8% (65,85 \pm 6,8 ^a nMol/g); Dexametasona (27,41 \pm 4,6 ^b nMol/g); CT 25 mg/Kg (45,26 \pm 4,8 nMol/g); CT 50 mg/Kg (31,30 \pm 3,6 ^b nMol/g); CT 100 mg/Kg (52,36 \pm 6,0 nMol/g).

GRUPOS EXPERIMENTAIS	MDA (nMol/g de tecido) (média \pm erro padrão)
Controle	26,48 \pm 3,0
Ácido Acético 8%	65,85 \pm 6,8 ^a
Dexametasona	27,41 \pm 4,6 ^b
CT 25 mg/Kg	45,26 \pm 4,8
CT 50 mg/Kg	31,30 \pm 3,6 ^b
CT 100 mg/Kg	52,36 \pm 6,0

Tabela 13 – Efeito das nanopartículas de ouro biossintetizado com *C. tamariscifolia* (Au@CT) sobre os níveis de malondialdéido (MDA) no cólon de camundongos submetidos ao modelo de colite experimental por ácido acético 8% (AA 8%). A tabela apresenta os resultados expressos em média \pm EPM dos níveis de MDA, em nMol/g de tecido. Os dados foram analisados pelo teste One-way ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni. ^ap < 0,05 versus grupo Controle; ^bp < 0,05 versus grupo Colite (Ácido acético 8%), onde o grupo controle apresentou (26,48 \pm 3,0 nMol/g); grupo ácido acético 8% (65,85 \pm 6,8^a nMol/g); grupo dexametasona (27,41 \pm 4,6^b nMol/g); Au@CT 25 mg/Kg (34,09 \pm 1,0^b nMol/g); Au@CT 50 mg/Kg (27,25 \pm 4,4^b nMol/g); Au@CT 100 mg/Kg (49,67 \pm 5,9 nMol/g).

GRUPOS EXPERIMENTAIS	MDA (nMol/g de tecido) (média \pm erro padrão)
Controle	26,48 \pm 3,0
Ácido Acético 8%	65,85 \pm 6,8 ^a
Dexametasona	27,41 \pm 4,6 ^b
Au@CT 25 mg/Kg	34,09 \pm 1,0 ^b
Au@CT 50 mg/Kg	27,25 \pm 4,4 ^b
Au@CT 100 mg/Kg	49,67 \pm 5,9

5.7. Determinação dos níveis de mieloperoxidase (MPO) no cólon de camundongos pré-tratados com extrato da alga *C. tamariscifolia* (CT, painel A) e pré-tratados com as nanopartículas de ouro biossintetizado com *C. tamariscifolia* (Au@CT, painel B) no modelo de colite experimental por ácido acético 8% (AA 8%)

A atividade da enzima mieloperoxidase (MPO), foi avaliada como um parâmetro para verificar a atividade anti-inflamatória do extrato da alga *C. tamariscifolia* (CT) na infiltração neutrofílica. Após três dias de indução da DC, amostras dos cólons foram submetidas ao ensaio. A Figura 19 (painel A) e a tabela 14 demonstram, que os animais do grupo AA 8% apresentaram aumento a atividade de MPO (unidade de MPO/mg de tecido) ($30,43 \pm 2,9$) em relação ao grupo de animais tratados com salina ($10,65 \pm 1,3$). CT 50m/Kg ($9,77 \pm 1,2$), bem como a dexametasona ($11,76 \pm 2,1$) diminuíram a infiltração de neutrófilos significativamente, quando comparado ao grupo AA 8% ($30,43 \pm 2,9$). Contudo, as doses de 25 ($21,97 \pm 2,4$) e 100 ($27,36 \pm 2,8$) mg/kg da CT não reverteu a aumento da MPO induzida por AA 8%. Au@CT nas doses de 25 ($15,13 \pm 1,9$) e 50 m/Kg ($11,11 \pm 1,7$), bem como a dexametasona ($11,76 \pm 2,1$) diminuíram a infiltração de neutrófilos significativamente, quando comparado ao grupo AA 8% ($30,43 \pm 2,9$). Contudo, a dose 100 ($29,19 \pm 2,9$) mg/kg da Au@CT não reverteu a aumento da MPO induzida por AA 8% (figura 19, painel B e a tabela 15).

Figura 19 - Efeito extrato da alga *C. tamariscifolia* (CT, painel A) e das nanopartículas de ouro biossintetizado com *C. tamariscifolia* (Au@CT) sobre os níveis de mieloperoxidase (MPO) no cólon de camundongos submetidos ao modelo de colite experimental por ácido acético 8% (AA 8%). As colunas representam a média \pm EPM dos níveis de MPO, expressos em unidade de MPO/mg de tecido. Os dados foram analisados pelo teste One-way ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni. ^ap < 0,05 versus grupo Controle; ^bp < 0,05 versus grupo Ácido acético 8%.

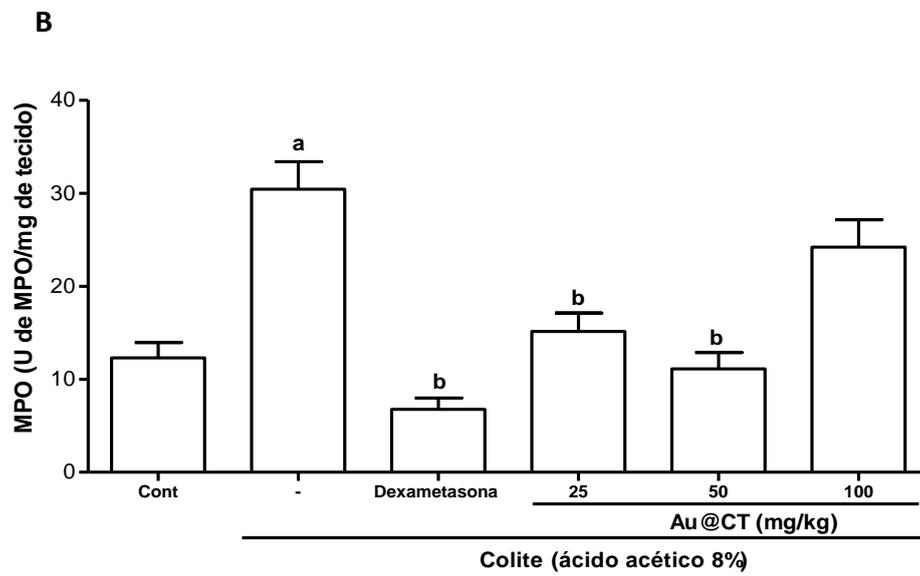
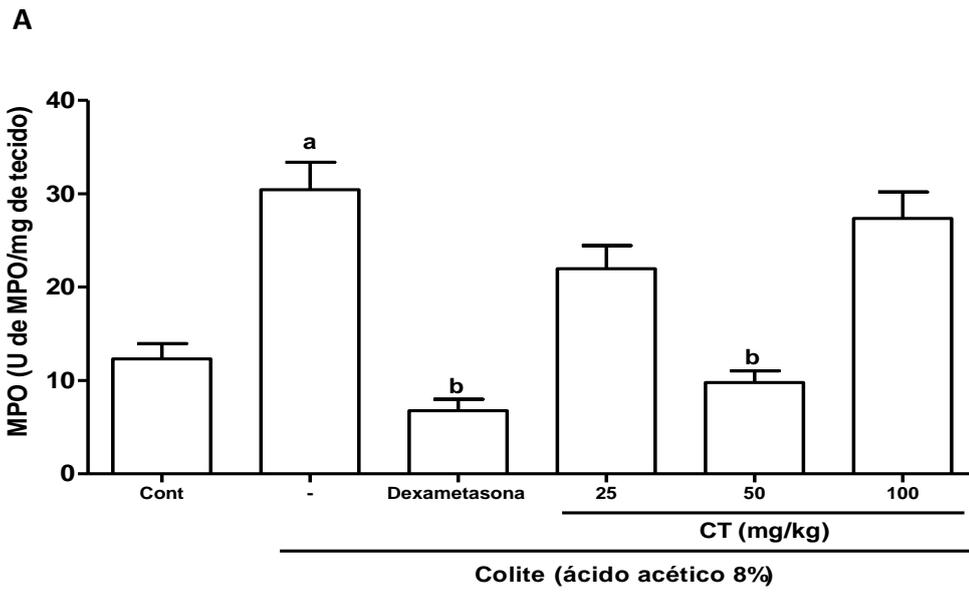


Tabela 14 – Efeito do extrato da alga *C. tamariscifolia* (CT) sobre os níveis de mieloperoxidase (MPO) no cólon de camundongos submetidos ao modelo de colite experimental por ácido acético 8% (AA 8%). A tabela apresenta os resultados expressos em média \pm EPM dos níveis de MPO, em unidade de MPO/mg de tecido. Os dados foram analisados pelo teste One-way ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni. ^ap < 0,05 versus grupo Controle; ^bp < 0,05 versus grupo Colite (Ácido acético 8%), onde o grupo controle apresentou (10,65 \pm 1,3); Ácido Acético 8% (30,43 \pm 2,9^a); Dexametasona (11,76 \pm 2,1^b); CT 25 mg/Kg (21,97 \pm 2,4); CT 50 mg/Kg (9,77 \pm 1,2^b); CT 100 mg/Kg (27,36 \pm 2,8).

GRUPOS EXPERIMENTAIS	MPO (unidade de MPO/mg de tecido) (média \pm erro padrão)
Controle	10,65 \pm 1,3
Ácido Acético 8%	30,43 \pm 2,9 ^a
Dexametasona	11,76 \pm 2,1 ^b
CT 25 mg/Kg	21,97 \pm 2,4
CT 50 mg/Kg	9,77 \pm 1,2 ^b
CT 100 mg/Kg	27,36 \pm 2,8

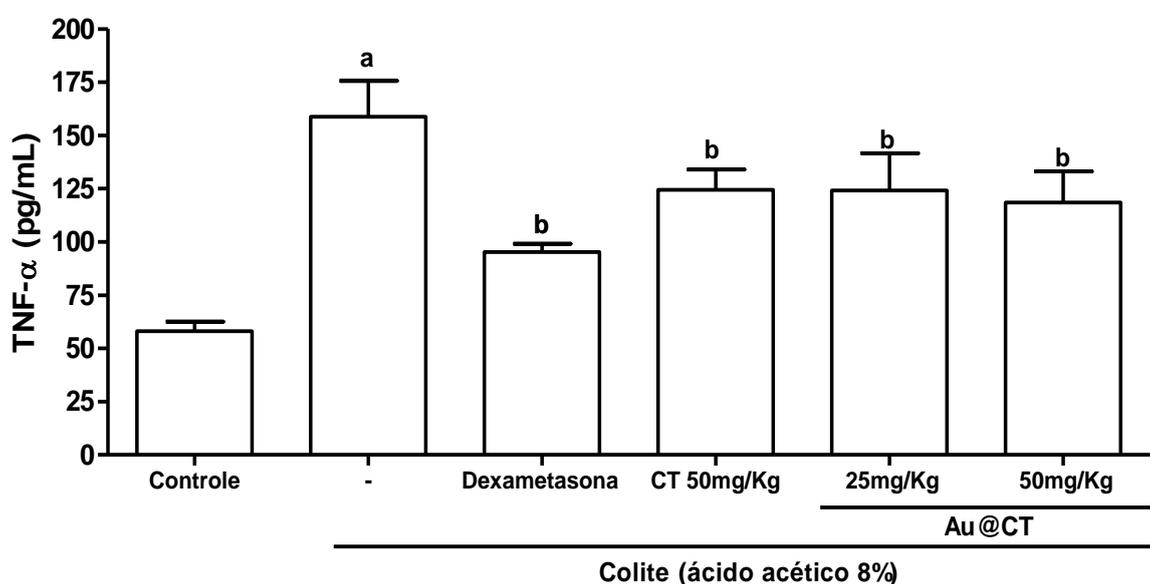
Tabela 15 – Efeito das nanopartículas de ouro biossintetizado com *C. tamariscifolia* (Au@CT) sobre os níveis de mieloperoxidase (MPO) no cólon de camundongos submetidos ao modelo de colite experimental por ácido acético 8% (AA 8%). A tabela apresenta os resultados expressos em média \pm EPM dos níveis de MPO, em unidade de MPO/mg de tecido. Os dados foram analisados pelo teste One-way ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni. ^ap< 0,05 versus grupo Controle; ^bp< 0,05 versus grupo Colite (Ácido acético 8%), onde o grupo controle apresentou (10,65 \pm 1,3); Ácido Acético 8% (30,43 \pm 2,9 ^a); Dexametasona (11,76 \pm 2,1^b); Au@CT 25 mg/Kg (15,13 \pm 1,9^b); Au@CT 50 mg/Kg (11,11 \pm 1,7^b); Au@CT 100 mg/Kg (29,19 \pm 2,9).

GRUPOS EXPERIMENTAIS	MPO (unidade de MPO/mg de tecido) (média \pm erro padrão)
Controle	10,65 \pm 1,3
Ácido Acético 8%	30,43 \pm 2,9 ^a
Dexametasona	11,76 \pm 2,1 ^b
Au@CT 25 mg/Kg	15,13 \pm 1,9 ^b
Au@CT 50 mg/Kg	11,11 \pm 1,7 ^b
Au@CT 100 mg/Kg	29,19 \pm 2,9

5.8. Efeito do extrato da alga *C. tamariscifolia* (CT) e das nanopartículas de ouro biossintetizado com *C. tamariscifolia* (Au@CT) nos níveis teciduais de TNF-alfa no modelo de colite experimental por ácido acético 8% (AA 8%)

As amostras colônicas foram submetidas ao ensaio para determinação dos níveis da citocina pró-inflamatória TNF- alfa (pg/mL). Os animais do grupo AA 8% apresentaram aumento significativo de TNF- alfa ($158,71 \pm 16,9$), em relação ao grupo controle ($58,14 \pm 4,4$). CT 50m/Kg ($124,4 \pm 9,6$) e Au@CT nas doses de 25 ($121,6 \pm 17,4$) e 50 m/Kg ($118,5 \pm 14,54$), bem como a dexametasona ($95,24 \pm 3,8$) diminuíram o nível desta citocina, quando comparado ao grupo AA 8% (Figura 20).

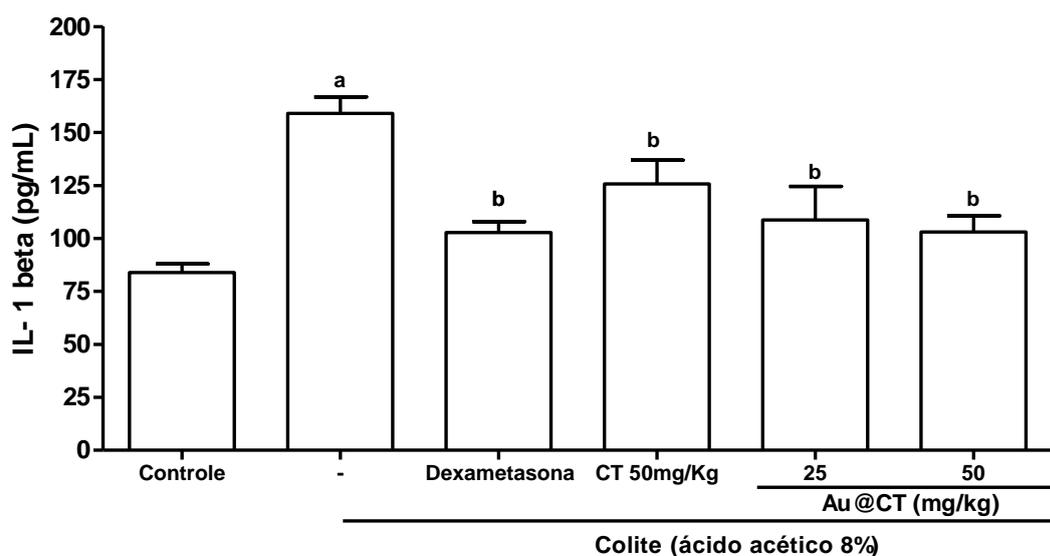
Figura 20 – O extrato da alga *C. tamariscifolia* (CT) e as nanopartículas de ouro biossintetizado com *C. tamariscifolia* (Au@CT) diminuíram os níveis teciduais de TNF-alfa no modelo de colite experimental por ácido acético 8% (AA 8%). As colunas representam a média \pm EPM dos níveis de TNF-alfa, expressos em pg/mL. Os dados foram analisados pelo teste One-way ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni. ^a $p < 0,05$ versus grupo Controle; ^b $p < 0,05$ versus grupo Ácido acético 8%.



5.9 Efeito do extrato da alga *C. tamariscifolia* (CT) e das nanopartículas de ouro biossintetizado com *C. tamariscifolia* (Au@CT) nos níveis teciduais de IL-1 beta no modelo de colite experimental por ácido acético 8% (AA 8%).

Para avaliação da citocina pró-inflamatória IL-1 beta, amostras colônicas foram submetidas ao ensaio por ELISA para determinação dos níveis desta citocina. Os animais do grupo AA 8% apresentaram aumento significativo de IL-1 beta ($159,3 \pm 7,8$), em relação ao grupo controle ($83,9 \pm 4,08$). CT 50m/Kg ($125,8 \pm 11,26$) e Au@CT nas doses de 25 ($108,7 \pm 15,8$) e 50 mg/Kg ($103,1 \pm 7,5$), bem como a dexametasona ($102,8 \pm 5,09$) diminuíram o nível desta citocina, quando comparado ao grupo AA 8% (Figura 21).

Figura 21 – O extrato da alga *C. tamariscifolia* (CT) e as nanopartículas de ouro biossintetizado com *C. tamariscifolia* (Au@CT) diminuíram os níveis teciduais de IL-1 beta no modelo de colite experimental por ácido acético 8% (AA 8%). As colunas representam a média \pm EPM dos níveis de IL-1 beta, expressos em pg/mL. Os dados foram analisados pelo teste One-way ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni. ^a $p < 0,05$ versus grupo Controle; ^b $p < 0,05$ versus grupo Ácido acético 8%.

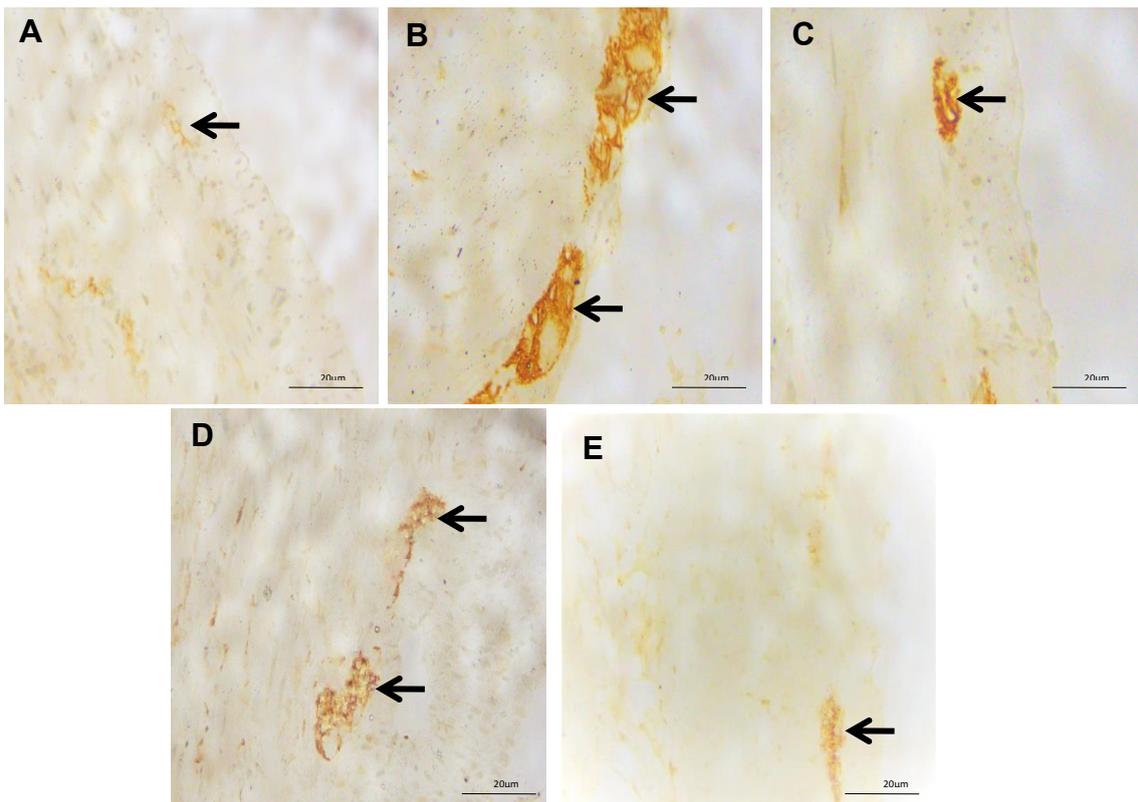


5.10 Efeito do extrato da alga *C. tamariscifolia* (CT) e das nanopartículas de ouro biossintetizado com *C. tamariscifolia* (Au@CT) sobre a imunomarcção para GFAP no modelo de colite experimental por ácido acético 8% (AA 8%)

No modelo experimental de colite por ácido acético 8% (AA 8%) observou-se um expressivo número de células gliais presente no plexo mioentérico imunomarcadas para GFAP (Figura 22, painel B) quando comparado ao grupo controle (Figura 22, painel A). Com base nas fotomicrografias apresentadas, o pré-tratamento com CT 50m/Kg (painel D) e Au@CT 50 m/Kg (painel E) diminuíram a imunomarcção de GFAP no plexo mioentérico dos animais submetidos a colite por AA 8%. Resultado semelhante ao apresentado pela dexametasona (painel C).

Para confirmar esses dados qualitativos apresentados na figura 22, realizou-se a contagem das células marcadas para GFAP. Conforme apresentado na figura 23, a imunomarcção para GFAP estava aumentada no grupo colite AA 8% ($17,63 \pm 3,76$), quando comparado ao grupo controle ($2,75 \pm 0,81$). CT 50m/Kg ($11,75 \pm 2,02$) e Au@CT 50 m/Kg ($8,53 \pm 1,45$), bem como a dexametasona ($7,71 \pm 1,41$), diminuíram a marcação ($p < 0,05$) quando comparado ao grupo colite AA 8%, na contagem de células positivas por campo para GFAP (figura 23).

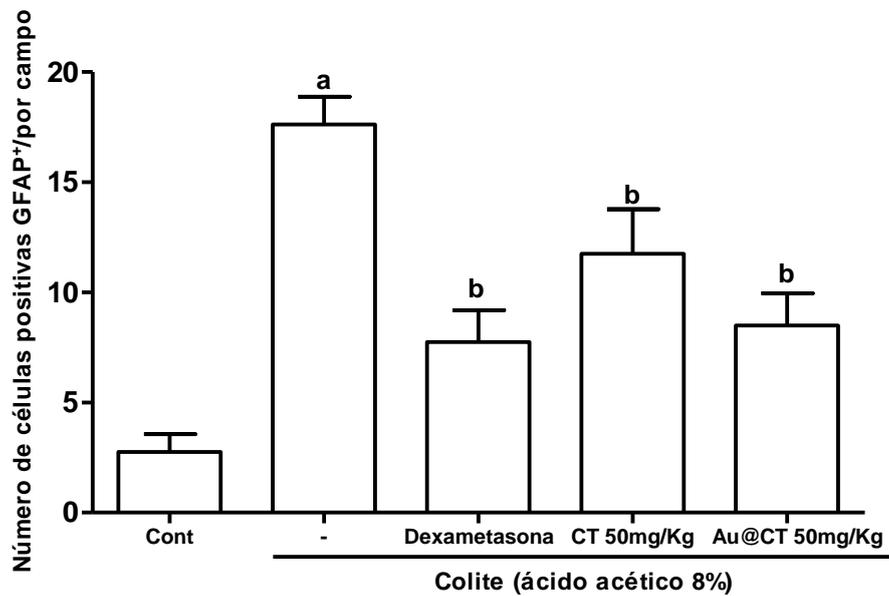
Figura 22 - Fotomicrografias representativas da imuno-histoquímica para marcação de GFAP nos plexos mioentéricos presentes no cólon dos camundongos submetidos a colite experimental por ácido acético 8% (AA 8%). (A) Grupo controle, (B) Grupo colite, (C) Grupo dexametasona, (D) Grupo CT 50 mg/Kg, (E) Grupo Au@CT 50 mg/Kg.



Fonte: Próprio autor.

Legenda: Setas pretas: plexo mioentérico imunomarcado para células gliais GFAP.

Figura 23 - O extrato da alga *C. tamariscifolia* (CT) e das nanopartículas de ouro biossintetizadas com *C. tamariscifolia* (Au@CT) diminuí o número de células imunomarcadas para GFAP no modelo de colite experimental por ácido acético 8% (AA 8%). As colunas representam a média \pm EPM de células imunomarcadas, expressos em número de células positivas GFAP⁺ por campo. Os dados foram analisados pelo teste One-way ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni. ^ap < 0,05 versus grupo Controle; ^bp < 0,05 versus grupo Ácido acético 8%.

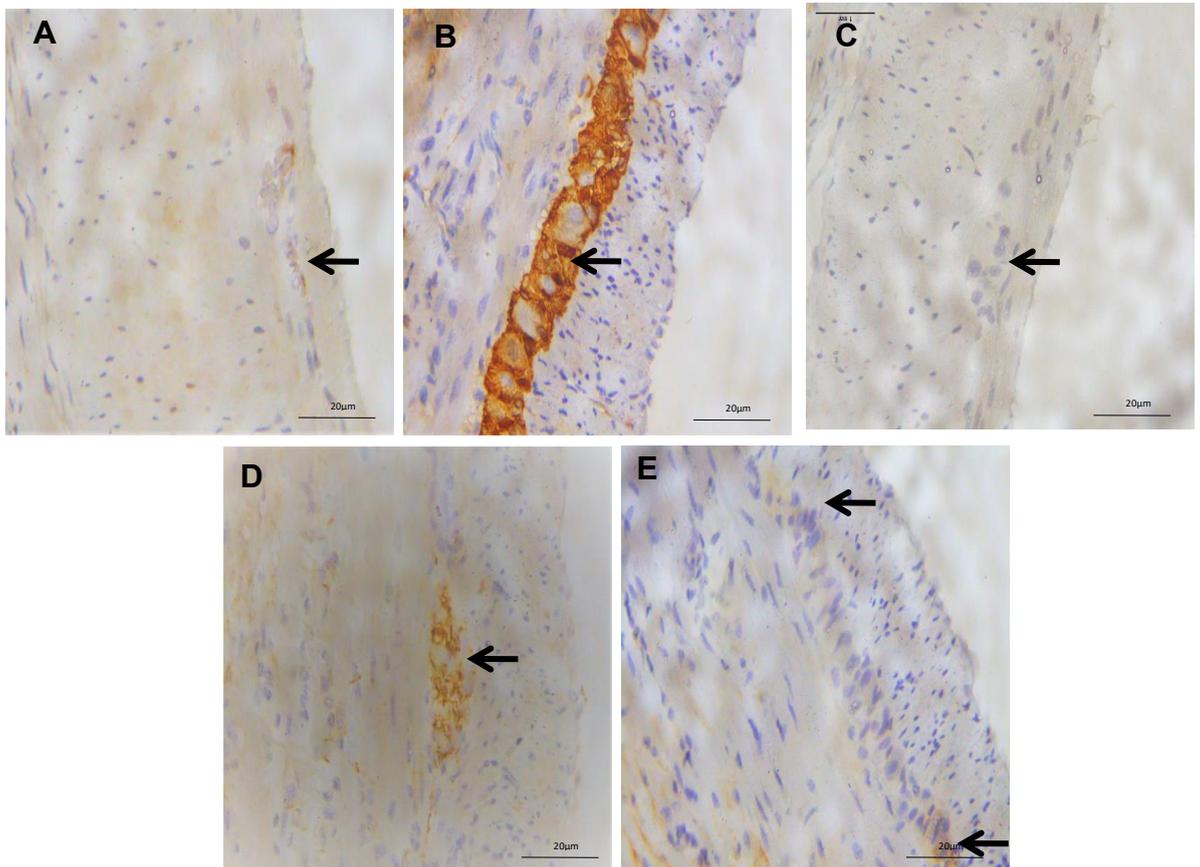


5.11 Efeito do extrato da alga *C. tamariscifolia* (CT) e das nanopartículas de ouro biossintetizado com *C. tamariscifolia* (Au@CT) sobre a imunomarcção para S100 beta no modelo de colite experimental por ácido acético 8% (AA 8%)

Com base nas fotomicrografias apresentadas na figura 24 é possível observar um aumento do número de células gliais presente no plexo mioentérico imunomarcadas para S100 beta no grupo colite por AA 8% (painel B), quando comparado ao grupo controle (painel A). O pré-tratamento com dexametasona (painel C), CT 50m/Kg (painel D) e Au@CT 50 m/Kg (painel E) diminuíram a imunomarcção de S100 beta no plexo mioentérico dos animais submetidos a colite por AA 8%.

Para confirmar esses dados qualitativos apresentados na figura 24, realizou-se a contagem das células marcadas para S100 beta. Na figura 25 observa-se um aumento significativo da marcação para S100 beta no grupo colite AA 8% ($22,88 \pm 3,18$), quando comparado o grupo controle ($4,87 \pm 1,74$). Dexametasona ($10,8 \pm 2,9$), CT 50m/Kg ($16,50 \pm 2,87$) e Au@CT 50 m/Kg ($11,88 \pm 2,04$) diminuíram a marcação ($p < 0,05$) quando comparado ao grupo colite AA 8%, na contagem de células positivas por campo para S100 beta (Figura 25).

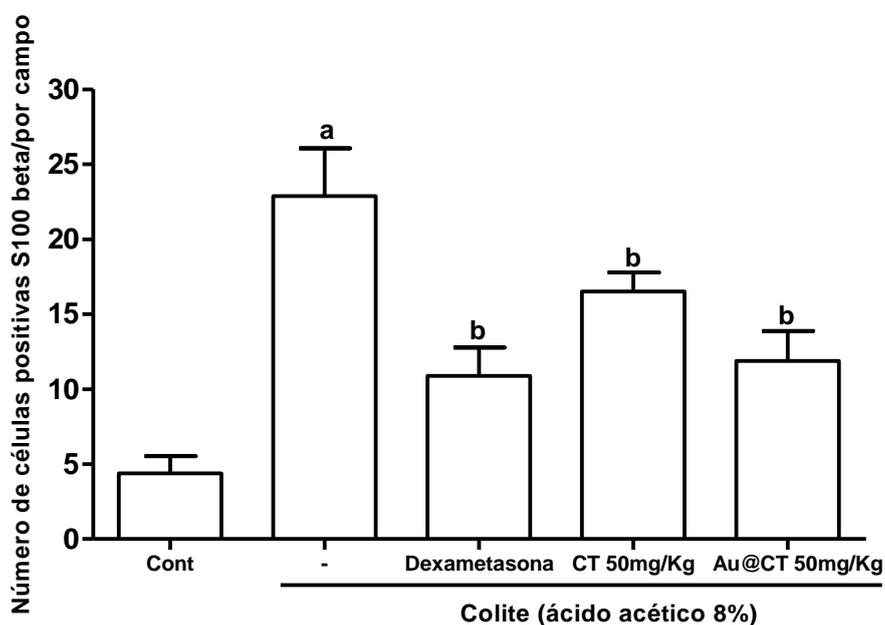
Figura 24 - Fotomicrografias representativas da imunohistoquímica para marcação de S100 beta nos plexos mioentéricos presentes no cólon dos camundongos submetidos a colite experimental por ácido acético 8% (AA 8%). (A) Grupo controle, (B) Grupo colite, (C) Grupo dexametasona, (D) Grupo CT 50 mg/Kg, (E) Grupo Au@CT 50 mg/Kg.



Fonte: Próprio autor.

Legenda: Setas pretas: plexo mioentérico imunomarcado para células gliais S100 beta.

Figura 25 - O extrato da alga *C. tamariscifolia* (CT) e das nanopartículas de ouro biossintetizadas com *C. tamariscifolia* (Au@CT) diminuí o número de células imunomarcadas para S100 beta no modelo de colite experimental por ácido acético 8% (AA 8%). As colunas representam a média \pm EPM de células imunomarcadas, expressos em número de células positivas S100 beta por campo. Os dados foram analisados pelo teste One-way ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni. ^ap < 0,05 versus grupo Controle; ^bp < 0,05 versus grupo Ácido acético 8%



6.0 DISCUSSÃO

Atualmente, a exata etiologia das DII é desconhecida (KIM; CHEON, 2017), porém vários fatores como, a susceptibilidade genética e fatores ambientais, possivelmente estejam ligados ao surgimento da DII (ZHOU et al., 2017), acredita-se também que a dieta ocidental de forma direta ou indireta, provoque a DII (RODRIGUEZ-PALACIOS et al., 2018).

Os modelos de indução de colite com agente químico (por exemplo, ácido acético) tem a vantagem de causar inflamação em linhagens puras de camundongos, com um sistema imune normal (NEURATH, 2012), são de fácil administração e baixo custo (LOW, et al. 2013). O ácido acético por via retal é capaz de reproduzir a colite de maneira difusa e dose-dependente, reprodutível na porção distal do cólon de camundongos (GUAZELLI, et al. 2013; MACPHERSON; PFEIFFER, 1978), reproduz inflamação semelhante a UC e DC em humanos, no que diz respeito mudanças moleculares, características histológicas e clínicas (GOYAL, et al. 2014). A resposta inflamatória ocorre devido ao rompimento da barreira epitelial (KAWADA; ARIHIRO; MIZOGUCHI, 2007), com consequente liberação de prótons no espaço extracelular, promovendo acidificação intracelular e dano ao epitélio (RANDHAWA, et al. 2014).

Também em ratos, o modelo de administração anal de ácido acético induz modelo de indução aguda que vem sendo utilizado extensamente em animais, uma vez que permite rapidamente a formação do processo inflamatório, sendo possível observar alterações após 12 horas de sua administração (FILMANN, 2007). Reproduz um processo inflamatório no colón com formação de abscessos crípticos, infiltrado de leucócitos, edema de submucosa e ulceração da mucosa (SALLES, et al. 2019).

Nossos dados corroboram com a literatura pois a administração do ácido acético à 8%, promoveu aumento nas lesões macroscópicas dos cólons dos camundongos.

Neste estudo observou-se um aumento dos escores macroscópicos de atividade inflamatória no grupo Colite, 12 horas após a indução da colite pelo AA 8%, quando comparados com os grupos controle e dexametasona. As doses de 25 e 50 mg/Kg, dos grupos CT, foram capazes de diminuir, os aspectos inflamatórios totais, quando comparado ao grupo colite. Não houve diferença entre os escores dos grupos

CT 100 mg/Kg em relação ao grupo colite.

Observou-se também os aspectos inflamatórios como: úlcera, hiperemia, edema e prolapso do cólon em animais do grupo colite e CT 100mg/Kg, quando comparado ao grupo controle. O pré-tratamento com dexametasona e CT nas doses de 25 e 50 mg/Kg, foram capazes de prevenir os aspectos inflamatórios citados anteriormente.

Estudos dos mecanismos intracelulares que levam à ruptura da barreira epitelial nesses distúrbios tiveram um crescente interesse, bem como o reforço dessa barreira de forma farmacológica. Em condições experimentais apropriadas, pode-se aumentar a barreira afetando principalmente a estrutura das junções e conseqüentemente reduzindo a permeabilidade da parede celular (COLLARES-BUZATO, 2001). Uma dessas condições é o tratamento com glicocorticóides, que podem diminuir a permeabilidade e, conseqüentemente, reduzir o edema *in vivo* (GUYTON; HALL, 1996).

A dexametasona, um glicocorticóide sintético que tem efeito direto na formação e manutenção das zonas de junções na linha celular endotelial cultivada (ROMERO *et al.*, 2003), utilizada nesse estudo, exerce funções das junções, onde modulam a localização, a estabilidade ou montagem de proteínas de junções na membrana celular (PEIXOTO, *et al.* 2006).

Ressaltamos que o extrato da alga CT e as nanopartículas de ouro biossintetizadas com *C. tamariscifolia* (Au@CT), apresentaram resultados semelhantes ao fármaco padrão dexametasona, indicando assim que a alga CT possui um efeito biológico promissor, semelhante ao fármaco padrão dexametasona.

Diante dos efeitos biológicos promissores da alga CT nos parâmetros macroscópicos e microscópicos avaliados, foi de extrema importância que os resultados fossem semelhantes. Corroborando com os trabalhos publicados por Brito, *et al.* (2016), que avaliando o efeito protetor das algas marinhas *Hypnea musciformina*, um tipo de alga vermelha, na colite induzida pelo TNBS em ratos encontraram para avaliação histológica redução significativa dos danos provocados pela indução da colite experimental. No presente trabalho, após o tratamento com a alga CT, os parâmetros microscópicos para o diagnóstico da inflamação induzida pelo ácido acético presentes na DC, incluindo perda da arquitetura de mucosa, espessamento da camada muscular, formação de abscessos, infiltrado celular inflamatório e ausência de células calciformes, foram diminuídos e semelhantes aos resultados apresentados pelo fármaco padrão (dexametasona).

É reconhecido que os compostos bioativos derivados de macroalgas com atividade neuroprotetora estão associados principalmente às algas marrons (57,6%), fazendo parte deste grupo a alga utilizada neste estudo a *Cystoseira tamariscifolia* (CT), com propriedades antioxidantes e antiinflamatórias, seguidas das vermelhas (28,3%), e algas verdes (14,1%) (ALGHAZIW, et al. 2016), esta condição neuroprotetora das algas marrons corroboram com os resultados positivos encontrados neste do estudo.

A nível de escores macroscópicos foram observados, o pré-tratamento com Au@CT protegeu o cólon de lesões induzidas pelo AA 8%, nas doses de 25 e 50 mg/Kg, quando comparado com o grupo colite. Resultado este semelhante ao observado com a droga padrão dexametasona. Não houve diferença importante entre o grupo CT 100 mg/kg, em relação ao grupo Colite.

O pré-tratamento, com Dexametasona ou Au@CT, nas doses de 25 e 50 mg/kg, foram capazes de prevenir os aspectos inflamatórios como: úlcera, hiperemia, edema e prolapso do cólon, quando comparado ao grupo Colite.

Au@CT 100 mg/Kg, não apresentou efeito semelhante as doses de 25 e 50 mg/Kg.

SELA, et al. (2015), diz que uma das características mais vantajosas de algumas nanopartículas (NPs) é a capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica (BHE), mostrando assim um caminho alternativo não invasivo por conta de suas características favoráveis, como tamanho reduzido e baixa hidrofília. JAVED, et al. (2019) refere que, além da boa capacidade de atravessar a BHE, os nanocarreadores apresentam outros parâmetros importantes, como por exemplo: bom direcionamento para o local alvo, toxicidade reduzida e alto tempo de circulação.

Na análise microscópica por escores totais de inflamação, segundo os critérios de Appleyard; Wallace, 1995, observou-se que o AA 8% promoveu alterações microscópicas importantes como: lesão hemorrágica, edema, perda de arquitetura e infiltração de células inflamatórias no cólon dos animais estudados, quando comparado com o grupo controle. O pré-tratamento, por via oral, com o extrato de CT na dose de 50 mg/kg, diminuiu ($p < 0,05$) os escores microscópicos citados anteriormente. Resultados semelhantes foram observados no grupo dexametasona.

A presença de infiltrado celular, perda da arquitetura da mucosa, hemorragia e depleção de células caliciformes, são observados na avaliação microscópica evidenciando assim o processo inflamatório intenso nos animais do grupo Colite (AA

8%), quando comparado ao grupo controle. No grupo Controle e grupo Dexametasona observa-se um aspecto colônico normal. Uma melhora dos aspectos inflamatórios induzidos pelo AA 8% foram observados nos animais pré-tratados com 50 mg/kg de CT, por via oral. Os grupos CT 25 e 100 mg/Kg não preveniram o efeito lesivo do AA 8%, apresentando um padrão inflamatório semelhante aos animais com colite.

A doença de Crohn induzida por ácido acético a 8% apresentou um aumento expressivo na concentração de IL-1beta e TNF-alfa, determinado por ELISA e imunohistoquímica. Depois de expressa no tecido, IL-1beta pode ser capaz de atrair leucócitos polimorfonucleares, que quando ativados sejam responsáveis pela transcrição de outras citocinas, como o TNF-alfa, via ativação de NFkB (KAMP, *et al.* 2011).

A administração de dexametasona, assim como o extrato da alga *Cystoseira tamariscifolia* na dose de 50 mg/kg e a nanopartícula de ouro com a alga CT nas doses de 25mg/kg e 50mg/kg, apresentaram redução significativa das citocinas IL-1beta e TNF-alfa no cólon dos animais com DC, sugerindo assim um efeito biológico provavelmente associado à regulação favorável sobre a citocina IL-1beta, inibindo assim a resposta inflamatória e facilitando o efeito protetor do cólon. O grupo dexametasona apresentou resultado semelhante aos grupos CT 50mg/kg e Au@CT 50mg/kg e Au@CT 25mg/kg. Esse efeito é esperado pois alguns glicocorticóides, como a dexametasona, são eficazes na inibição da cascata inflamatória e impedem a transcrição de mediadores como o TNF-alfa (MORA *et al.*, 2012).

Quanto aos resultados relacionados a alga CT, isto se deve pela presença dos polissacarídeos sulfatados de algumas espécies de *Cystoseira* apresentarem atividades antirradicais, anti-inflamatórias e gastroprotetoras (AMMAR. HH. *et al.*, 2015). Além disso, alguns esteróides e pigmentos da espécie *Cystoseira* também apresentam atividade antitumoral.

A reação inflamatória induzida pelo ácido acético leva a um aumento da excitabilidade dos neurônios entéricos da mucosa do cólon e contribui para a persistência da neuropatia entérica (PONTELL *et al.*, 2009). Segundo Furness 2023, a rede neural do plexo mioentérico está envolvida intimamente com a regulação reflexa das atividades contráteis da musculatura externa intestinal. Conforme a literatura tem mostrado o SNE é muito afetado nas doenças inflamatórias intestinais, apresentando necrose, apoptose e degeneração dos gânglios entéricos (LOMAX *et al.*, 2005). No trato digestório a isquemia/reperfusão intestinal promove a perda

significativa dos neurônios do plexo mioentérico e submucoso, bem como uma diminuição da densidade e do tamanho dos neurônios, resultando em alterações importantes da motilidade intestinal (PAULINO *et al.*, 2011; PALOMBIT *et al.*, 2013).

Na doença de Crohn, a inflamação transmural está associada com lesões do sistema nervoso entérico, como hipertrofia e hiperplasia dos neurônios, e um aumento irregular no número de fibras nervosas, gânglios e aumento na quantidade de células gliais. O aumento da quantidade de células gliais pode refletir a severidade da inflamação. Nesse estudo os grupos CT na dose de 50mg/kg e Au@CT nas doses de 25mg/kg e 50mg/kg, em comparação ao grupo colite, promoveram a manutenção das células gliais do plexo mioentérico, assim como o grupo dexametasona, conferindo assim a integridade da motilidade intestinal, via sistema nervoso entérico (SNE), já que a preservação das células gliais está intimamente ligada a preservação dos neurônios mioentéricos.

A alga utilizada em nosso estudo além de possuir papel anti-inflamatório, também possui efeito neuroprotetor (GONÇALVES, *et al.* 2023). o que corrobora com os nossos resultados a nível de preservação de células gliais.

7.0 CONCLUSÃO

Diante dos nossos resultados podemos concluir que o extrato da alga *Cystoseira tamariscifolia* (CT), assim como as nanopartículas de ouro biossintetizadas com o extrato da alga *Cystoseira tamariscifolia* (Au@CT) apresentam atividade antioxidante, anti-inflamatória e neuroprotetora expressiva, no modelo experimental de Doença de Crohn por ácido acético. Provavelmente esses achados ocorreram devido a regulação inflamatória e oxidativa e neuroprotetora presente nos compostos bioativos da alga *Cystoseira tamariscifolia* e das nanopartículas de ouro, sugerindo assim uma alternativa terapêutica natural para o tratamento da DC e de outras desordens inflamatórias intestinais.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRANTES JL, BARBOSA J, CAVALCANTI D, PEREIRA RC, FREDERICO FONTES CL, TEIXEIRA VL, MORENO SOUZA TL, PAIXÃO ICP. **The effects of the diterpenes isolated from the Brazilian brown algae *Dictyota paffii* and *Dictyota menstrualis* against the herpes simplex type-1 replicative cycle.** *Planta Med.* 2010;76:339–344.

ALGHAZI, M.; KAN, YQ; ZHANG.; GAI, P; GARSON, MJ.; SMID, S. **Atividades neuroprotetoras de produtos naturais de macroalgas marinhas durante 1999–2015.** *J. Appl. Ficol.* 2016, 28, 3599–3616.

American Cancer Society. **Colorectal Cancer Facts & Figures 2020-2022.** Atlanta, Ga: American Cancer Society; 2020.

AMICO, V. 1995. **Marine brown algae of family Cystoseiraceae: Chemistry and chemotaxonomy.** *Phytochemistry* 39, 1257-1279.

ANDRADE PB, BARBOSA M, MATOS RP, LOPES G, VINHOLES J, MOUGA T, VALENTÃO P. **Valuable compounds in macroalgae extracts.** *Food Chem.* 2013;138:1819–28.

Ardre, F. (1970). **Contribution à l'étude des algues marines du Portugal. I. La flore.** *Portugaliae Acta Biologica, Série B, Sistemática, Ecologia, Biogeografia e Paleontologia* 10: 137-555.

Association, fatos e números da doença de Alzheimer em 2020. *Demência de Alzheimer.* 2020, 16, 391–460.

BRITO RCV, PERES CL, SILVEIRA KAF, ARRUDA EL, ALMEIDA JUNIOR MP. **Doenças inflamatórias intestinais no Brasil: perfil das internações, entre os anos de 2009 a 2019.** *Rev. Educ.Saúde.* 2020;8(1):127-13.

BOUGUEN G, LEVESQUE BG, FEAGAN BG, KAVANAUGH A, PEYRIN-BIROULET L, COLOMBEL JF, ET AL. **Treatto target: a proposed new paradigm for the management of Crohn's disease.** *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2015; 13:1042-50.e2. PMID: 24036054.

BERMEJO, R.; DE LA FUENTE, G.; RAMIREZ-ROMERO, E.; VERGARA, JJ; HERNANDEZ, I. **Variabilidade espacial e resposta a pressões antrópicas de assembléias dominadas por um habitat formador de algas marinhas sensíveis à poluição (costa norte do Mar de Alboran).** *Mar. Poluição. Touro.* 2016, 105, 255–264.

BALBOA, EM; CONDE, E.; Moure, A.; FALQUE, E.; DOMINGUEZ, H. **Propriedades antioxidantes in vitro de extratos brutos e compostos de algas marrons.** *Química Alimentar.* 2013, 138, 1764-1785.

BARBOSA, A. L. R. **Sulfated polysaccharide from the marine algae *Hypnea musciformis* inhibits TNBS-induced intestinal damage in rats.** Carbohydrate Polymers, v.151, p. 957–964, 2016.

BASSOTTI, G.; VILLANACCI, V.; FISOGNI, S.; ROSSI, E.; BARONIO, P.; CLERICI, C.; MAURER, C. A.; CATHOMAS, G.; ANTONELLI, E. **Enteric glial cells and their role in gastrointestinal motor abnormalities: Introducing the neuro-gliopathies**. World J Gastroenterol; n.13 v.30 p.4035-4041, 2007.

BINDER, H. J. **Mechanisms of diarrhea in inflammatory bowel diseases.** Annals of the New York academy of sciences, v. 1165, n. 1, p. 285-293, 2009.

BOUGUEN G, LEVESQUE BG, FEAGAN BG, KAVANAUGH A, PEYRIN-BIROULET L, COLOMBEL JF, ET AL. **Treat to target: a proposed new paradigm for the management of Crohn's disease.** Clin Gastroenterol Hepatol. 2015;13:1042-50.e2. PMID: 24036054.

BRITO, T. V.; BARROS, F. C.N.; SILVA, R.O.; DIAS, G.J.J; SIMIÃO C.J.J; FRANCO, X.A.; SOARES, P.M.G.; CHAVES,L.S.; ABREU, C.M.W.S.; DE PAULA, R.C.M. SOUZA, M.H.L.P.; FREITAS, A.L. P.; BARBOSA, A. L. R. **Sulfated polysaccharide from the marine algae *Hypnea musciformis* inhibits TNBS-induced intestinal damage in rats.** Carbohydrate Polymers, v.151, p. 957–964, 2016.

CABRERA TRUJILLO, LY. **O que é nanotecnologia e por que ela é importante?** Da ciência à ética. NanoEthics 2014, 8, 211–213.

C.AGALJ,M.; SKROZA, D.; RAZOLA-DIAZ, MDC.; VERARDO,V.; BASSI,D.;FRLETA, R.;GENERALIC´ MEKINIC´, I.; TABANELLI, G.; ŠIMAT, V. **Variações na composição, atividades antioxidantes e antimicrobianas de *Cystoseira compressa* durante o crescimento sazonal.** Mar. Drugs 2022, 20, 64.

CARDOZO W.S.; SOBRADO C.W.**Doença Inflamatória Intestinal.** 2ed. Barueri-SP: Manole, 2015.

CARUSO, L. **Distúrbios do trato digestório.** In: CUPPARI, L. Guia de nutrição: clínica do adulto. 3 ed. Barueri, SP: Manole, 2014. 297-325p.

CASTELUCCI, P.; DE SOUZA, R. R.; DE ANGELIS, R. C.; FURNESS, J. B.;LIBERTI, E. A. **Effects of pre-and postanal protein deprivation and postanal**

refeeding on myenteric neurons of the rat large intestine: a quantitative morphological study. *Cell Tissue Res.*, v. 310, p. 1-7, 2002a. doi:10.1007/s00441-002-0615-y PMID:12242478

CHEIFETZ, A. S. **Management of active Crohn disease.** *JAMA*, v. 309, p. 2150-2158, 2013.

CHOUDHARY R.; MADHURI R. GREEN. **Metal Nanoparticles**; Scrivener Publishing LLC:2018;pp629-665.

CIRILLO, C.; SARNELLI, G.; TURCO, F.; MANGO, A.; GROSSO, M.; APREA, G.; MASONE, S.; CUOMO, R. **Proinflammatory stimuli activates human-derived enterogial cells and induces autocrine nitric oxide production.** *Neurogastroenterol. Motil.*, v. 23, p. 372-382, 2011.

COLLARES-BUZATO, C.B. **Junções Celulares.** In: **Carvalho HF, Recco-Pimentel SM, editors.** *A Célula* 2001. Campinas: Manole Ltda; 2001. p. 57-76.

COLLINS SM. **The immunomodulation of enteric neuromuscular function: implications for motility and inflammatory disorders.** *Gastroenterology* 1996. 111:1683–1699.

DA SILVA, M.V.; MAROSTI, A.R.; MENDES, C.E.; PALOMBIT, K.; CASTELUCCI, P. **Differential effects of experimental ulcerative colitis on P2X7 receptor expression in enteric neurons.** *Histochem Cell Biol.* n. 142 v. 2p. 171-184, 2015.

DA SILVA, M.V.; MAROSTI, A.R.; MENDES, C.E.; PALOMBIT, K.; CASTELUCCI, P. **Submucosal neurons and enteric glial cells expressing the P2X7 receptor in rat experimental colitis.** *Acta histochemica*, v. 119, n. 5, p.481-494, 2017.

DAPERNO, M.; SOSTEGNI, R.; LAVAGNA, A.; CROCELLA, L., ERCOLE, E.; RIGAZIO, C.; ROCCA, R.; PERA, A. **The role of endoscopy in inflammatory bowel disease.** *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, v.8, n.5, p.209, 2004.

DEWICK PM. **Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach.** 2 Ed. John Wiley & Sons, Lda, Chichester, UK; 2002.

DIAS D, URBAN S, ROESSNER U. **A historical overview of natural products in drug discovery.** *Metabolites.* 2012;2:303–36.

DOGIEL, AS. **U ¨ber den Bau der Ganglien in den Geflechtendes Darmesund der Gallenblase des Menschen und der Sa ¨ugestiere [German].** Arch Anat Physiol Leyipzig. Anat Abt Jg. 1899;130–158.

Domínguez H. **Functional ingredients from algae for foods and nutraceuticals.** Domínguez H, editor. Oxford, UK. Woodhead Publishing Limited. 2013.

EL-SAID GF, EL-SIKAILY A. **Chemical composition of some seaweed from Mediterranean Sea coast, Egypt.** Environ Monit Assess. 2013;185:6089–99.

FERRERES, F.; LOPES, G.; GIL-IZQUIERDO, A.; ANDRADE, PB; SOUSA, C.; MOUGA, T.; VALENTAO, P. **Extratos de florotaninos de fucales caracterizado por HPLC-DAD-ESI-MSn: Abordagens à capacidade inibitória da hialuronidase e propriedades antioxidantes.** Mar. Drugs 2012, 10, 2766–2781.

FERRI, G.; PROBERT, L.; COCCHIA, D.; MICHETTI, F.; MARANGOS, P. P.; POLAK, J. M. **Evidence for the presence of S-100 protein in the glial component of the human enteric nervous system.** Nature. V. 297 p. 409- 410, 1982.

FILLMANN, S.H. **O efeito protetor da glutamina na colite experimental induzida por ácido acético.** Dissertação. 91 f. (Doutorado em Ciências Biológicas – Fisiologia), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2007.

FIOCCHI C. **Inflammatory bowel disease: etiology and pathogenesis.** Gastroenterology; v.115, p.182-205, 1998.

FLORES C. **Doenças Inflamatórias Intestinais: Acompanhamento Endoscópico.** Projeto Diretrizes Sociedade Brasileira de Endoscopia Digestiva, 2008.

FRÓES, R.S.B. **Tratamento convencional na doença inflamatória intestinal.** Revista Hospital Universitário Pedro Ernesto, v.11, n.4, p.27-32, 2012.

FURNESS, J. B.; COSTA, M. **The enteric nervous system.** England: Churchill Livingstone, 1987.

FURNESS, J. B.; ALEX, G.; CLARK, M. J.; LAL, V. V. **Morphologies and projections of defined classes of neurons in the submucosa of the guinea-pig small intestine.** *Anat. Rec.*, v. n. 272, p. 475-483, 2003.

FURNESS, J. B. **The Enteric Nervous System.** Austrália: Blackwell Publishing, 2006a.

FURNESS, J. B. **The enteric nervous system and neurogastroenterology.** *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.*, v. 9, n. 5, p. 286-294, 2012.

FUSS, I. J. ET AL. **Nonclassical CD1d-restricted NK T cells that produce IL-13 characterize an atypical Th2 response in ulcerative colitis.** *The Journal of Clinical Investigation*, v. 113, p. 1490–1497, 2004.

GABELLA G. **Fine structure of the myenteric plexus in the guineapig ileum.** *J Anat.* 1972;111:69–97.

GALEAZZI, F.; HAAPALA, E. M.; VAN ROOJEN, N.; VALLANCE, B., COLLINS, S. M. **Inflammation-induced impairment of nerve function in nematode-infected mice is macrophage-dependent.** *Am. J. Physiol.* v.278, p. G259–G265, 2000.

GEBOES, K., COLLINS, S.M. **Structural abnormalities of the nervous system in Crohn's disease and ulcerative colitis.** *Neurogastroenterol. Mol.* V.10, p. 189–202., 1998.

GONÇALVES, A.; FERNANDES, M.; LIMA, M.; GOMES, J.P.; SILVA, F.; CASTRO, S.; SAMPAIO, F.; GOMES, A.C. **Nanotechnology to the Rescue: Therapeutic Strategies Based on Brown Algae for Neurodegenerative Diseases.** *Appl. Sci.* **2023**, **13**, 1883.

GONZALEZ-MARTINEZ, P.; PEREZ-PIÑERA, P.; DÍAZ-ESNAL, B.; VEJA, J. A. **S100 proteins in the human peripheral nervous system.** *Microscopy Research and Technique*, v. 60, p. 633-638, 2003.

GOUVEIA, V.; SECA A. M. L.; BARRETO, M. C.; SILVA, A. M. S.; KIJJOA, A. **6SPJ-OCS**, Book of Abstracts, Lisbon, July, 2012.

GOYAL, N. ET AL. **Animal models of inflammatory bowel disease: A review.** *Inflammopharmacology*, v. 22, n. 4, p. 219–233, 2014.

GULBRANSEN, B. D.; SHARKEY, K. A. **Novel functional roles for enteric glia in the gastrointestinal tract.** *Nature reviews Gastroenterology & hepatology*, v. 9, n. 11, p. 625, 2012.

GUNER, A.; KOKSAL, C.; EREL, SB; KAYALAR, H.; NALBANTSOY, A.; SUKATAR, A KARABAY YAVASOGLU, NU. **Antimicrobiano e antioxidanteatividades com toxicidade aguda, citotoxicidade e mutagenicidade de Cystoseira compressa (Esper) Ge loff & Nizamuddin da costa de Urla (Izmir, Turquia).** *Cytotechnology* 2015, 67, 135–143.

HAGSTRÖM, C.; OLSSON, C. **Glial cells revealed by GFAP immunoreactivity in fish gut.** *Cell Tissue Res.*, v. 341, p. 73-81, 2010.

HANANI, M.; FRANCKE, M.; HÄRTIG, W.; GROSCHE, J.; REICHENBACH, A.; PANICKE, T. **Patch-clamp study of neurons and glial cells in isolated myenteric ganglia.** *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* v.4 n.278 p. 644-651, 2000.

HSIEH, H. L.; SCHÄFER, B. W.; WEIGLE, B.; HEIZMANN, C. W. **S100 protein translocation in response to extracellular S100 is mediated by receptor for advanced glycation endproducts in human endothelial cells.** *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 316, p. 949–959, 2004.

JACOBSON, K.; MCHUGH, K.; COLLINS, S. M. **The mechanism of altered neural function in a rat model of acute colitis.** *Gastroenterology*, v.112, p.156 – 162, 1997.

JESSEN, K.R; MIRSKY, R. **Astrocyte-like glia in the peripheral nervous system: an immunohistochemical study of enteric glia.** *J Neurosci.* v.3 n.11 p. 2206-2218, 1983.

KAMP, D. W.; SHACTER, E.; WEITZMAN, S. A. **Chronic inflammation and cancer: the role of the mitochondria.** *Oncology*, v.25, n. 5, p.400, 2011.

KAWADA, M.; ARIHIRO, A.; MIZOGUCHI, E. **Insights from advances in research Of chemically induced experimental models of human inflammatory bowel disease.** World journal of gastroenterology: WJG, v. 13, n.42, p. 5581-5593, 2007.

KHORSHIDI, M. ET AL. **A posteriori dietary patterns and risk of inflammatory bowel disease: a meta-analysis of observational studies.** International Journal for Vitamin and Nutrition Research. Boston, v. 90, n. 3-4, p. 376-384, jun. 2020.

KIM, D. H.; CHEON, J. H. **Pathogenesis of inflammatory bowel disease and recente advances in biologic therapies.** Immune Network. Seoul, v. 17, n. 1, p. 25-40, fev. 2017.

KOBERLE F. **Chagas' disease and chagas' syndromes: The pathology of american trypanosomiasis.** 1968 Adv Parasitol 6:63-116.

KOTZE L.M.S; KOTZE P.G; KOTZE L.R; **Doença de Crohn. In: DANI R; PASSOS M.C.F;** Gastroenterologia Essencial. p. 347-379, Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2011.

KRAAK, L.V.D.; GROS, P.; BEAUCHEMIN, N. **Colitis – associated colon cancer: is it in your genes?.** Gastroenterology, v.21, p.11688-11699. 2015.

LEE, CC; GILLIES, ER; FOX, ME; GUILLAUDEU, SJ; FRECHET, JM; DY, EE; SZOKA, FC. **Uma única dose de dendrímero de gravata borboleta funcionalizado com doxorubicina cura camundongos portadores de carcinomas de cólon C-26.** Proc. Nacional Acad. ciência EUA 2006, 103, 16649–16654.

LEE YS, SHIN KH, KIM B, LEE S. **Anti-Diabetic Activities of Fucosterol from Pelvetia siliquosa.** 2004;27:1120–2.

LEIGHTON J.A.; SHEN B.; BARON T.H.; ADLER D.G; DAVILA R.; EGAN J.V.; FAIGEL D.O.; GAN S.I; HIROTA W.K.; LICHTENSTEIN D.; QURESHI W.A. **ASGE guideline: endoscopy in the diagnosis and treatment of inflammatory bowel disease.** Gastrointestinal endoscopy, v.63, n.4, p.558-65, 2006.

LENZ, G. **Efeito da lesão com ácido cáínico sobre a fosforilação e o imuno conteúdo da proteína glial fibrilar ácida em hipocampo de ratos.** Porto Alegre:

UFRGS, 1996.

LOMAX , A.E.; FERNANDEZ, E.; SHARKEY, K.A. **Plasticity of the enteric nervous system during intestinal inflammation.** *Neurogastroenterol Motil*, v.17 ,p. 4-15, 2005.

LOPES, GLL. **Algas da Costa Portuguesa: Química, Capacidade Antimicrobiana e Antiinflamatória.** doutorado Tese, Universidade do Porto, Porto, Portugal, 2014.

LOPES G, SOUSA C, BERNARDO J, ANDRADE PB, VALENTÃO P, FERRERES F, MOUGA T. **Sterol Profiles in 18 Macroalgae of the Portuguese Coast.** *J Phycol.* 2011;47:1210–8.

LOW, D.; NGUYEN, D. D.; MIZOGUCHI, E. **Animal models of ulcerative colitis and their application in drug research.** *Drug Design, Development and Therapy*, v. 7, p. 1341–1356, 2013.

LUO, P.; LIU, D.; LI, C.; HE, W. X.; ZHANG, C. L.; CHANG, M. J. **Enteric glial cell activation protects enteric neurons from damage due to diabetes in part via the promotion of neurotrophic factor release.** *Neurogastroenterology & Motility*, p. e13368, 2018.

LUQUE DE CASTRO M., GARCIA-AYUSO L. **Soxhlet extraction of solid materials: an outdated technique with a promising innovative future.** *Anal Chim Acta.* 1998;369:1–10.

MACHADO, S.; GONZÁLEZ-BALLESTEROS, N.; GONÇALVES, A.; MAGALHÃES, L.; SÁRRIA PEREIRA DE PASSOS, M.; RODRÍGUEZ-ARGÜELLES, MC; CASTRO GOMES, A. **Toxicidade in vitro e em peixes-zebra Desenvolvimento embrionário de nanopartículas de ouro biossintetizadas a partir de extratos de macroalgas *Cystoseira*.** *Int. J. Nanomed.* 2021, 16, 5017–5036.

MACPHERSON, B. R.; PFEIFFER, C. J. **Experimental production of diffuse colitis in rats.** *Digestion*, v. 17, n. 2, p. 135–150, 1978.

MAGRO, D.O, SANTOS A, GUADAGNINI D, PINHEIRO LV, MARTINEZ CAR, SAAD MJA, ET AL. **Relação da quantidade de mucinas, *Saccharomyces cerevisiae* e microbiota intestinal na doença de Crohn.** *J Chem Inf Model.* 2019;53(9):1689–99.

MAGRO, D. O. et al. **Visceral fat is increased in patients with Crohn's disease: a comparative analysis with healthy controls.** Arquivos de Gastroenterologia. v. 55, n. 2, p. 142-147, jun. 2018.

MANDALARI, G. et al. **Natural almond skin reduced oxidative stress and inflammation in an experimental model of inflammatory bowel disease.** International Immunopharmacology, v. 11, p. 915–924, 2011.

MANKERTZ, J.; SCHULZKE, J.-D. **Altered permeability in inflammatory bowel disease: pathophysiology and clinical implications.** Current opinion in gastroenterology, v. 23, n. 4, p. 379-383, 2007.

MANSUR, AA; BROWN, MT; BILLINGTON, RA. **A atividade citotóxica de extratos da alga marrom *Cystoseira tamariscifolia* (Hudson) Papenfuss, contra linhagens de células cancerígenas muda sazonalmente.** J. Appl. Ficol. 2020, 32, 2419–2429.

MARCHANT, GE **Small is Beautiful: O que a nanotecnologia pode fazer pela medicina personalizada?** atual farm. Pers. Med. 2009, 7, 231–237.

MENDES, C. E.; PALOMBIT, K.; VIEIRA, C.; SILVA, I.; CORREIA-DE-SÁ, P.; CASTELUCCI, P. **The Effect of Ischemia and Reperfusion on Enteric Glial Cells and Contractile Activity in the Ileum.** Dig Dis Sci. v.9 n.60 p.2677-2689, 2015.

MHADHEBI, L.; LAROCHE-CLARY, A.; ROBERTO, J.; BOURAOU, A. **Atividades antioxidantes, antiinflamatórias e antiproliferativas de frações orgânicas da alga marrom mediterrânea *Cystoseira sedoides*.** Pode. J. Physiol. Pharmacol. 2011, 89, 911–921.

MHADHEBI, L.; MHADHEBI, A.; ROBERTO, J.; BOURAOU, A. **Efeitos antioxidantes, antiinflamatórios e antiproliferativos de extratos aquosos de três algas marrons mediterrâneas do gênero *Cystoseira*.** Irã. J. Pharm. Res. 2014, 13, 207–220.

MIYASHITA K, MIKAMI N, HOSOKAWA M. **Chemical and nutritional characteristics of brown seaweed lipids: A review.** J Funct Foods. 2013;5:1507–17.

MOHY EL-DIN, SM; MOHYELDIN, MM. **Análise de Componentes e Atividade Antifúngica dos Compostos Extraídos de Quatro Algas Marrons com Diferentes Solventes em Diferentes Estações.** J. Oceano. Univ. China 2018, 17, 1178–1188.

MOJA, L.; DANESE, S; FIORINO, G.; DEL GIOVANE, C.; BONOVAS, S. **Systematic review with network meta-analysis: comparative efficacy and safety of budesonide and mesalazine (mesalamine) for Crohn's disease.** Aliment Pharmacol Ther, v. 41, p.1055-1065, 2015.

MONTEIRO, L.; HERRERO, M.; IBANEZ, E.; CIFUENTES, A. **Separação e caracterização de florotaninos de algas marrons *Cystoseira abies-marina* por cromatografia líquida bidimensional abrangente.** Eletroforese 2014, 35, 1644-1651.

MORA, E.; GUGLIELMOTTI, A.; BIONDI, G.; SASSONE-CORSI, P. **BindaritAn anti-inflammatory small molecule that modulates the NFκB pathway.** Cell Cycle, v.11, n.1, p. 159–169, 2012.

MORRIS, G., P. BECK, M. HERRIDGE, W. DEPEW, M. SZEWCZUK, J. WALLACE, HAPTEN. **Induced model of chronic inflammation and ulceration in the rat colon,** Gastroenterology. v. 96, p. 795–803, 1989.

MUKHERJEE, B. **Nanosize drug delivery sistema.** atual farm. Biotecnologia. 2013, 14, 1221.

NEURATH, M. F. **Animal models of inflammatory bowel diseases: Illuminating the pathogenesis of colitis, ileitis and cancer.** Digestive Diseases, v. 30, n. SUPPL. 1, p. 91–94, 2012.

NOOLI, M.; CHELLA, N.; KULHARI, H.; SHASTRI, NR; SISTLA, R. **Nanopartículas lipídicas sólidas como vesículas para administração oral de olmesartanmedoxomil: Formulação, otimização e avaliação in vivo.** Desenvolvimento de Drogas Ind. Pharm. 2017, 43, 611–617.

OKURA, U.; HIRASHIMA, N.; TANAKA, M. **Calcineurin B1 Deficiency in Glial Cells Reduces Gastrointestinal Motility and Results in Maldigestion and/or Malabsorption in Mice.** Biological and Pharmaceutical Bulletin, v.42, n. 7, p. 1230-1235, 2019.

ORELLANA, S.; HERNÁNDEZ, M.; SANSÓN, M. **Diversidade de Cystoseira sensu lato (Fucales, Phaeophyceae) no Atlântico oriental e Mediterrâneo com base em evidências morfológicas e de DNA, incluindo Carpodesmia gen. emendar. e Treptacantha gen. emendar.** EUR. J. Ficol. 2019, 54, 447–465.

ORIÁ, REINALDO BARRETO; BRITO, GERLY ANNE DE CASTRO (org.). **Sistema digestório : integração básico-clínica [livro eletrônico]** / -- São Paulo : Blucher, 2016.

Pal A, Kamthania MC, Kumar A. Bioactive Compounds and Properties of Seaweeds—A Review. OALib. 2014;01:1–17.

PALOMBIT, K.; MENDES, C. E.; TAVARES DE LIMA, W.; CASTELUCCI, P. **Effects of ischemia and reperfusion on subpopulations of rat enteric neurons expressing the P2X7 receptor.** Dig. Dis. Sci., v. 58, p. 3429-3439, 2013.

PARK N-H, CHOI J-S, HWANG S-Y, KIM Y-C, HONG Y-K, CHO K, COI I. **Antimicrobial activities of stearidonic and gamma-linolenic acids from the green seaweed Enteromorpha linza against several oral pathogenic bacteria.** Bot Stud. 2013;54:39.

PARK, S. C.; JEEN, Y. T. **Genetic studies of inflammatory bowel disease-focusing on asian patients.** Cells. v. 8, n. 5, p. 1-22, maio 2019. Disponível em <https://www.mdpi.com/2073-4409/8/5/404>.

PAULINO AS, PALOMBIT K, CAVRIANI G, TAVARES-DE-LIMA W, MIZUNO MS, MAROSTI AR, DA SILVA MV, GIROTTI PA, LIBERTI EA, CASTELUCCI P (2011) **Effects of ischemia and reperfusion on P2X2 receptor expressing neurons of the rat ileum enteric nervous system.** Dig Dis Sci 56:2262–2277.
doi:10.1007/s10620-011-1588-z.

PEIXOTO, E.B.; COLLARES-BUZATO. **Modulation of the epithelial barrier by dexamethasone and prolactin in cultured Madin-Darby canine kidney (MDCK) cells.** Cell Biol Int, v. 30, n. 2, p. 101-113, 2006.

PEREIRA L. **As Algas Marinhas e Respectivas Utilidades**. Universidade de Coimbra; 2008.

PEREIRA L. **A Review of the Nutrient Composition of Selected Edible Seaweeds - Chapter 2**. In: Pomin VH, editor. "Seaweed: Ecology, Nutrient Composition and Medicinal Uses." Coimbra: Nova Science Publishers Inc.; 2011. p. 15–47.

PEREIRA, L. **Macroalgas**. Enciclopédia 2021, 1, 177–188.

POCHARD., C. et al. **The multiple faces of inflammatory enteric glial cells: is Crohn's disease a gliopathy?** American Journal of Physiology Gastrointestinal and Liver Physiology. United States, v. 315, n. 1, p. G1-G11, jul. 2018.

PONTELL L, CASTELUCCI P, BAGYÁNSZKI M, JOVIC T, THACKER M, NURGALI K, BRON R, FURNESS JB. **Structural changes in the epithelium of the small intestine and immune cell infiltration of enteric ganglia following acute mucosal damage and local inflammation**. *Virchows Arch*. 2009.

PRADO-LÓPEZS.;GONZÁLEZ-BALLESTEROSN.;RODRÍGUEZ ARGÜELLES M.C. **Biomaterial in clinical practice. Advances in clinical research and medical devices**; Springer: Switzerland, 2018; pp407-428.

QIN L.;ZENG G.;LAI C.;HUANG D.;XU P.;ZHANG C.;CHENG M.;LIU X.;LIU S.;LIB.;YIH. **Coord.Chem.Rev.**2018,359,1-31.

RAJESHKUMAR, S.; ABOELFETO, EF; BALUSAMY, SR; ALI, D.; ALMARZOU, MHA; TESFAYE, JL; KRISHNARAJ, R. **Anticancerígeno, antibacteriano aprimorado e potencial de eliminação de radicais livres de nanopartículas de prata mediadas por fucoidan (fonte de fucus vesiculosus)**. *Med. Oxidativo. Célula. Longev.* 2021, 2021, 8511576.

RAMLUKAN K, MOODLEY KG, BUX F. **An evaluation of the efficacy of using selected solvents for the extraction of lipids from algal biomass by the soxhlet extraction method**. *Fuel*. 2014;116:103–8.

Ramos PAB, Guerra ÂR, Guerreiro O, Freire CSR, Silva AMS, Duarte MF, Silvestre AJD. **Lipophilic extracts of *Cynara cardunculus* L. var. *atilis* (DC): a source of valuable bioactive terpenic compounds**. *J Agric Food Chem*. 2013;61:8420–9.

RANDHAWA, P. K. et al. **A review on chemical-induced inflammatory bowel disease models in rodents.** Korean Journal of Physiology and Pharmacology, v. 18, n. 4, p. 279–288, 2014.

RENATA DE S. B. FRÓES, **Tratamento convencional da doença inflamatória intestinal.** Revista do Hospital Universitário Pedro Ernesto, UERJ., ano 11, outubro/dezembro 2012.

ROCHA DE OLIVEIRA, A.; MARTINS DE OLIVEIRA MAIA, L.; PEREIRA BARBALHO, A.; BARBOSA BRANDÃO, L.; TERRA PASSOS, M. A. **“A importância da colonoscopia nas doenças inflamatórias intestinais”.** Revista de Saúde, [S. l.], v. 10, n. 1Sup, p. 08–12, 2019. DOI: 10.21727/rs. v10i1Sup.1715.

RODRIGUEZ-PALACIOS, A. et al. **The Artificial Sweetener Splenda Promotes Gut Proteobacteria, Dysbiosis, and Myeloperoxidase Reactivity in Crohn’s Disease–Like Ileitis.** Inflammatory Bowel Disease. Oxford, v. 24, n. 5, p. 1005-1020, maio 2018.

RUBERTO, G.; BARATA, MT; BIONDI, DM; AMICO, V. **Atividade antioxidante de extratos de algas marinhas do gênero Cystoseira em sistema modelo micelar.** J. Appl. Ficol. 2001, 13, 403–407.

RÜHL A. **Glial cells in the gut.** Neurogastroenterol. Motil., v.17, p. 777-790, 2005.

RÜHL, A.; NASSER, Y.; SHARKEY, K. A. **Enteric Glia.** Neurogastroenterol., v. 16, p. 44-49, 2004.

SALLES, L. A.; VIEIRA DE SOUZA L. MELLO, E.; MEDEIROS DE MELLO, J.; MARÇAL NATALI, M. R. **DOENÇA DE CROHN: MODELOS EXPERIMENTAIS E ALTERNATIVAS TERAPÊUTICAS.** Arquivos do Mudi, v. 23, n. 3, p. 614-625, 29 jan. 2020.

SANTOS SAO, VILELA C, FREIRE CSR, ABREU MH, ROCHA SM, SILVESTRE AJD. **Chlorophyta and Rhodophyta macroalgae: A source of health promoting phytochemicals.** Food Chem. 2015;183:122–8.

SARTOR RB. **Mechanisms of Disease: pathogenesis of Crohn's disease and ulcerative colitis.** USA. Nature Publishing Group: Gastroenterology & Hepatology, v.3, n. 7, p. 390-407, 2006.

SAVIDGE, T. C.; NEWMAN, P.; POTHOUKAKIS, C.; RUHL, A.; NEUNLIST, M.; BOURREILLE, A.; HURST, R.; SOFRONIEW, M. V. **Enteric glia regulate intestinal barrier function and inflammation via release of S-nitrosoglutathione.** Gastroenterology, v. 132, p. 1344-1358, 2007.

Scott, NR; Chen, H.; Cui, H. **Aplicações de Nanotecnologia e Implicações de Agroquímicos para Agricultura Sustentável e Sistemas Alimentares.** J. Agric. Química Alimentar. 2018, 66, 6451–6456.

SELA, H.; COHEN, H.; ELIA, P.; ZACH, R.; KARPAS, Z.; ZEIRI, Y. **Penetração espontânea de nanopartículas de ouro através da barreira hematoencefálica (BHE).** J. Nanobiotechnol. 2015, 13, 71.

Sousa-Pinto I. **The seaweed resources of Portugal.** In: Critchley AT, Ohno M, editors. **Seaweed resources of the world.** Yokosuka: Japan International Cooperation Agency. 1998 p. 176–184.

Starmans IDAJ, Nijhuis HH. **Extraction of secondary metabolites from plant material: A review.** Trends in Food Science & Technology. 1996; 71:191–7.

STROBER, W.; FUSS, IJ.; BLUMBERG, R.S. **The immunology of mucosal models of inflammation.** Annual Review Immunology. v. 20, p. 495–549, 2002.

Thomas NV, Kim S-K. **Potential pharmacological applications of polyphenolic derivatives from marine brown algae.** Environ Toxicol Pharmacol. 2011;32:325–35

THORESON, R.; CULLEN, J. J. **Pathophysiology of inflammatory bowel disease: an overview.** Surgical Clinics of North America, v. 87, n. 3, p. 575-585, 2007.

TOUMI, F.; NEUNLIST, M.; CASSAGNAU, E.; PAROIS, S.; LABOISSE, C. L.; GALMICHE, J. P.; JARRY, A. **Human submucosal neurones regulate intestinal epithelial cell proliferation: evidence from a novel co-culture model.** Neurogastroenterol. Motil., v. 15, p. 239-242, 2003.

Trincherro J, Ponce Nma, Córdoba Ol, Flores MI, Pampuro S, Stortz Ca, Salomón H, Turk G. **Antiretroviral Activity of Fucoïdians Extracted from the Brown Seaweed *Adenocystis utricularis***. 2009;23:707–12.

TRIFAN, A.; VASINCU, A.; LUCA, SV; NEOPHYTOU, C.; WOLFRAM, E.; OPITZ, SEW; SAVA, D.; BUCUR, L.; CIOROIU, BI; MIRON, A.; **Desvendando o potencial das algas marinhas da costa do Mar Negro da Romênia como fontes de compostos bioativos. Parte I: *Cystoseira barbata* (Stackhouse) C. Agardh**. Química Alimentar. Tóxico. 2019, 134, 110820.

TRINDADE, S. S. "**Prospecção de compostos bioativos nas macroalgas *Bifurcaria bifurcata*, *Cystoseira tamariscifolia* e *Sargassum muticum***." Master's thesis, Universidade de Aveiro, 2016.

VICENTINI, A.F.et al. **Treatment with *Trichiliacatigua ethyl-acetate fraction* improves healing and reduces oxidative stress in TNBS- induced colitis in rats**. Biomedicine & Pharmacotherapy v. 107, p. 194-202,2018.

VILELA C, SANTOS SAO, COELHO D, SILVA AMS, FREIRE CSR, NETO CP, SILVESTRE AJD. **Screening of lipophilic and phenolic extractives from different morphological parts of *Halimione portulacoides***. Ind Crops Prod. 2014;52:373–9.

VIZETTO-DUARTE C, PEREIRA H, BRUNO DE SOUSA C, RAUTER AP, ALBERICIO F, CUSTO'DIO L, BARREIRA L, VARELA J. 2015. **Perfil de ácidos graxos de diferentes espécies de algas do gênero *Cystoseira*: uma perspectiva nutracêutica**. Nat Prod Res. 2:1–7.

VON BOYEN, G. **The role of enteric glia in gut inflammation**. Neuron Glia Biol. v.21 p.1-6, 2011.

WILCE, RT ***Pleurocladia Lacustris* na América Ártica (1)**. J. FICOL. 1966, 2, 57–66.

WGO. **World Gastroenterology Organization**. Practice Guidelines. 2015. <https://www.worldgastroenterology.org/UserFiles/file/guidelines/inflammatory-bowel-disease-portuguese-2015.pdf>

WORLD GASTROENTEROLOGY ORGANISATION PRACTICE GUIDELINES. Doença inflamatória intestinal: uma perspectiva global. World Gastroenterology Organisation, v.1, n.1, 2009.

YANG C, CHUNG D, SHIN I-S, LEE H, KIM J, LEE Y, YOU S. **Effects of molecular weight and hydrolysis conditions on anticancer activity of fucoidans from sporophyll of *Undaria pinnatifida***. Int J Biol Macromol. 2008;43:433–7.

YETISEN, AK; QU, H.; MANBACHI, A.; BUMBUM, H.; DOKMECI, MR; HINESTROZA, JP; SKOROBOGATIY, M.; KHADEMHOSEINI, A.; YUN, SH **Nanotecnologia em Têxteis**. ACS Nano 2016, 10, 3042–3068.

ZHANG, W.; SEGURA, B.J.; LIN, T.R.; HU, Y.; MULHOLLAND, M.W. **Inter-cellular calcium waves incultured enteric glia from neonatal guinea pig. Glia**. V.42 n.3 p. 252-262, 2003.

ZHOU, M. et al. **New frontiers in genetics, gut microbiota, and immunity: a rosetta stone for the pathogenesis of inflammatory bowel disease**. BioMed Research International. v. 2017, p. 1-17, 2017.

ZUBIA M, FABRE MS, KERJEAN V, LANN K LE, STIGER-POUVREAU V, FAUCHON M, DESLANDES E. **Antioxidant and antitumoural activities of some Phaeophyta from Brittany coasts**. Food Chem. 2009;116:693–701.

APÊNDICE A- FÁRMACOS, REAGENTES E SOLUÇÕES

Fármacos

Fármaco	Princípio Ativo	Fabricante
Calmin	Xilazina 2%	Agener União
Cetamin	Cloridrato de cetamina 10%	Syntec
Decadron Injetável	Fosfato dissódico de dexametasona	Aché
Ácido Acético 8%	Ácido acético 8%	Êxodo científica
Extrato alga <i>Cystoseira tamariscifolia</i> e <i>Cystoseira tamariscifolia</i> com nanopartículas de ouro	Extrato alga <i>Cystoseira tamariscifolia</i> e <i>Cystoseira tamariscifolia</i> com nanopartículas de ouro	Cedidas pela Dra. Andréa Castro Gomes, da Universidade do Minho, Portugal.

Reagentes

Reagentes/materiais	Fabricante
Acetona	Dinâmica
Ácido acético	Êxodo científica
Ácido fosfórico (H ₃ PO ₄)	Vetec química fina
Ácido tiobarbitúrico (TBA)	Mp biomedicals
Ácido tricloroacético (TCA)	Dinâmica
Ácido tricloroacético (TCA) a 50%	Dinâmica
Álcool Absolute	Êxodo científica
Anticorpo COX-2	Abcam
Anticorpo de captura (IL-1 β e TNF- α)	IL1: Santa cruz e TNF- α :Abcam
Anticorpo IL1	Santa cruz
Anticorpo INOS	Abcam
Anticorpo TNF- α e polímero	Abcam
Avidina-peroxidase	Dako
Cloreto de potássio (KCL)	Dinâmica
Cloreto de Sódio (NaCl)	Sigma- Aldrich
Cloreto de Tolonio (Azul de Toluidina)	Gasypath
DAB	Dako

Diidrocloreto de O-dianisidina	Sigma- Aldrich
Diluyente de anticorpo	Spring Bioscience
DPPH	Sigma- Aldrich
DTNB	Sigma- Aldrich
EDTA bissódico P.A	Êxodo científica
Estreptomocina	Gibco
Etanol	Dinâmica
Fosfato de Potássio Dibásico	Dinâmica
Fosfato de Potássio Monobásico	Dinâmica
Fosfato Sódio (NaH ₂ PO ₄)	Sigma- Aldrich
GSH	Sigma- Aldrich
HCL	Dako
Hexano	Dinâmica
Hidroxido de calcio	Sigma- Aldrich
HTAB	Dinâmica
Insulina	Sigma- Aldrich
KiT citocinas para TNF e IL1	R&D Systems
Metanol	Dinâmica
MTT brometo de [3-(4,5 dimetiltiazol-2-il)-2,5- difeniltetrazólio],	Sigma- Aldrich
n-Butanol	Dinâmica
OPD o-fenilenediaminadiidrocloreto	Dako
Peróxido de Hidrogênio	Dako
Solução de parada (dosagem de citocinas)	R&D Systems
Sulfato anidro	Synth
Tris	Promega
Trolox	Sigma- Aldrich
Tween 20	Biorad
Xilol	Dinâmica
Formol (H ₂ CO)	Dinâmica
Solução Salina Tamponada de	Dulbecco

Fosfato (PBS)

Soluções**Soluções**

Anticorpo biotinizado

Formol tamponado 10%

PreparoTampão de lavagem
1% de soro de carneiro6,5g de fosfato de sódio dibásico
4g de fosfato de sódio monobásico
800 mL de água destilada
Após dissolver as substâncias,
adicionar 100 mL de formaldeído
37%.

Completar para 1000 mL.

Solução Ácido Fosfórico 1%	1,176ml do H ₃ PO ₄ 85% para, 100mL de H ₃ PO ₄ 1%
Solução Acido Tiobarbitúrico 0,6%	0,6g de Ácido tiobarbitúrico em, 100mL de Ácido acético 7%
Solução de Dianisidina	27mL de água destilada 5mg de Dianisidina (cromóforo- cancerígeno) 3ml do tampão fosfato, 15µl de H ₂ O ₂ 1%. OBS: Fazer esse procedimento protegido da luz;
Solução de DTNB	13,2 mg de DTNB 3,33 mL de metanol Observação: Proteger a solução da luz.
Solução de EDTA 0,02M	10mL de solução de EDTA 0,2M 100mL de água destilada
Solução de EDTA 0,2M	1,737g EDTA 23,3mL de água destilada
Solução de H ₂ O ₂ a 3%	3mL de peróxido de hidrogênio (água oxigenada) 97mL de água destilada. OBS: manter me vidro âmbar
Solução de H ₂ O ₂ 1%	30 µl de H ₂ O ₂ 30% 970 µL de água destilada.
	25 mmol/L de glicose, 10 mg de insulina (10 µg/mL) 50 UI/mL de penicilina

	50 µg/mL de estreptomicina
Solução KCL 1,15% (0,15M)	1,15g de KCl 100ml de água destilada
Tampão citrato pH 6,0	29,4g Citrato de Sódio 1000 mL H ₂ O Ajustar pH 6,0 com HCL 1M
Tampão fosfato de potássio	Solução A: 6,8g de fosfato de potássio monobásico em 1L de água destilada. Solução B: 8,7g de fosfato de potássio dibásico em 1L de água destilada. OBS: Armazenar ambos em refrigeração. Tampão fosfato: 988mL de A + 12mL de B para preparar 1L de tampão
Tampão HTAP 0,5%	5g de HTAB (pó) + 1L de Tampão fosfato de potássio. Ajustar o pH em 6,0. OBS: Armazenar ambos em refrigeração.
Tampão TRIS	4,84g de tris 10 mL de 0,2 M EDTA Ajustar o pH para 8,9
Tripsina a 0,05%	Pesar 0,5 g de tripsina e dissolver em 50 mL de PBS [10X]. Completar o volume para 400 mL (água MilliQ).
Metanol aquoso a 5%	5mL de metanol 95mL de H ₂ O
Água destilada acidificada com HCl 0,1M	Dissolver 8,4mL de HCL concentrado em água e completar à 1L
PBS- Tween 20 a 0,1%	Cloreto de sódio 137 mM Cloreto de Potássio 2,7 mM Fosfato dissódico 4,3 mM Fosfato monopotássico 1,4 mM 0,1% (v / v) de Tween-20 (Polisorbato 20)
Solução tamponada de fosforo (PBS)	Solução Tampão PBS – pH 7.2 [10x] NaCl.....82 gr Na ₂ HPO ₄ 10,5 gr qsp 1L de H ₂ O NaH ₂ PO ₄ + H ₂ O.....3,55 gr OBS: Solução concentrada, portanto diluir 100 ml de PBS para cada 900 ml de H ₂ O (Milli-Q).
Solução de DPPH a 0,1mm	0,0394g DPPH Completar com 10mL de metanol OBS: Preparo em ambiente escuro Armazenar em refrigeração

	Preparo do DPPH à 1:100 v/v: 100 µL da solução de DPPH a 0,1mm 100 mL de metanol a 80%
--	--