



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE FARMÁCIA, ODONTOLOGIA E ENFERMAGEM
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**EFEITO CITOPROTETOR E ANTIOXIDANTE DE CURCUMINOIDES
SINTÉTICOS MONOCARBONILADOS EM MACRÓFAGOS MURINOS:
ENVOLVIMENTO DA VIA Keap1/Nrf2/ARE**

MATEUS EDSON DA SILVA

FORTALEZA

2025

MATEUS EDSON DA SILVA

EFEITO CITOPROTETOR E ANTIOXIDANTE DE CURCUMINOIDES SINTÉTICOS
MONOCARBONILADOS EM MACRÓFAGOS MURINOS: ENVOLVIMENTO DA VIA
Keap1/Nrf2/ARE

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Linha da pesquisa: Biologia para a saúde.

Orientador: Prof. Dr. Ramon Róseo Paula Pessoa Bezerra de Menezes.
Co-orientador: Prof. Dr. Tiago Lima Sampaio.

FORTALEZA

2025

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)

S581e Silva, Mateus Edson da.

Efeito citoprotetor e antioxidante de curcumoides sintéticos monocarbonilados em macrófagos murinos: envolvimento da via Keap1/Nrf2/ARE / Mateus Edson da Silva. – 2025.
85 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Fortaleza, 2025.

Orientação: Prof. Dr. Ramon Róseo Paula Pessoa Bezerra de Menezes.

Coorientação: Prof. Dr. Tiago Lima Sampaio.

1. Curcumina. 2. Estresse Oxidativo. 3. Nrf2. I. Título.

CDD 615

MATEUS EDSON DA SILVA

EFEITO CITOPROTETOR E ANTIOXIDANTE DE CURCUMINOIDES SINTÉTICOS
MONOCARBONILADOS EM MACRÓFAGOS MURINOS: ENVOLVIMENTO DA VIA
Keap1/Nrf2/ARE

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, da Universidade Federal do Ceará.

Aprovado em: ____ / ____ / ____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Ramon Róseo Paula Pessoa Bezerra de Menezes (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Alice Maria Costa Martins
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Renata de Sousa Alves
Universidade Federal do Ceará (UFC)

“Se você só fizer o que sabe, nunca será mais do que é agora”
-Mestre Shifu (Kung Fu panda 3)

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pelo dom da vida e pelos desafios que me fortaleceram nessa jornada.

À minha família, em especial aos meus pais, que sacrificaram seus sonhos, seu lazer e seu tempo de qualidade pela minha educação.

À minha irmã, que é a pessoa por quem tenho mais amor no mundo, pelos momentos juntos, pelo apoio, pelas brigas e por sempre estar ao meu lado.

Ao meu orientador, Professor Ramon, a pessoa mais inteligente que eu conheço, por sempre me mostrar o que eu posso ser, pelos carões, pelas ideias, pelas correções, pelos dias saindo tarde da noite (ou madrugada) fazendo experimentos e pelos momentos que voltou à bancada para me ajudar nas demandas de experimentos. Me inspiro no senhor e o tenho como um pai.

Ao meu co-orientador, Professor Tiago, por ter sido a primeira pessoa a me enxergar na faculdade, desde as aulas na sexta-feira até às 13:00 h, até nas provas (jamais perdoarei a Espironolactona), na monitoria, além de todos os momentos que lhe perturbava a noite com meus problemas pessoais. Obrigado pela sua empatia e seu instinto paternal e acolhedor que faz com que as pessoas sintam-se confortáveis ao seu redor e obrigado por me aconselhar em tudo o que eu demandeи ao senhor (e não foi pouco).

À minha tão querida Professora Goretti, por todo reconhecimento e apoio, sua determinação é o que me pôs no lugar onde estou hoje.

À professora Renata, por todo o seu carinho e pelo acolhimento, poucas pessoas no mundo possuem a sua generosidade, compaixão e humanidade e, a qual nunca, sequer uma vez, ouvi dizer más palavras.

À professora Alice, uma das maiores pesquisadoras da instituição, por seu estímulo, incentivo e amor aos seus alunos, à produção científica e à formação de pesquisadores e profissionais.

Ao meu mestre e amigo Dr. Glaudemberg, com quem tive o imenso prazer de trabalhar e aprender. O termo “se doar” representa um eufemismo perto do que você faz pelo seu trabalho. O empenho que você emprega em tudo que faz me admira e sou eternamente grato por tudo o que fez por mim.

Ao professor Hélcio por ceder as moléculas estudadas nesse trabalho.

Aos professores Alexandre Havit e Marco Clementino e ao Davi Benevides pelo apoio

nos ensaios de biologia molecular.

Ao professor Emanuel Marinho e seu laboratório pelo apoio no estudo *In Silico*.

Ao professor Said, pelos inúmeros empréstimos de materiais, equipamentos, espaço e insumos necessários à realização deste e de outros trabalhos que bati na sua porta para pedir.

Ao meu amor, por sempre ouvir meus constantes desabafos, descontentamentos e reclamações. Desculpa por precisar de você mais do que você de mim e desculpa por demandar mais do seu apoio do que eu consegui te apoiar. Você me tornou um homem mais paciente e compreensivo e eu te agradeço imensamente por isso. Te amo.

À minha amiga Beatriz Maria por todas as idas ao supermercado, por todos os almoços, por todas as vezes que me abrigou, dentre muitas outras coisas que fez por mim sem nem questionar. Vejo muito da professora Renata em você e acho que por isso sua parceria com ela deu tão certo, são as pessoas com o maior coração que eu já conheci.

À minha amiga Bruna Viana *Make up professional*, por ser o meu modelo de controle financeiro e a minha futura representante discente e por não poupar esforços em ajudar todos ao seu redor. Você compartilha tanta coisa com todo mundo que te cerca e isso se dá pela sua energia de líder que inspira as pessoas.

Ao meu amigo e primeiro IC Vitor, que mesmo depois de assumir seus próprios experimentos, sempre me ajudou quando eu precisei. Nunca serei capaz de agradecer completamente sua participação nesse trabalho.

Ao meu amigo e atual IC Gabriel que, mesmo questionando absolutamente tudo, sempre faz com excelência tudo que lhe é solicitado, mesmo que isso signifique sair tarde do laboratório ou chegar às 06:00 h, às vezes ambos. Apesar dos seus constantes questionamentos e reclamações, sei que isso é o que te torna um bom pesquisador, a sua vontade de entender tudo o que faz ao invés de seguir cegamente instruções. Obrigado também por me acolher quando precisei, espero continuar ouvindo o seu “Pô, chatão” por muito tempo ainda.

Ao meu amigo Felipe, por ser meu confidente, por me ensinar sobre diferenças, sobre amor, sobre maturidade e sobre respeitar o tempo e espaço pessoal das pessoas (eu ainda não sou muito bom nesse último), muito obrigado por me receber mesmo doente e me ajudar na escrita de detalhes químicos que eu estava empacado a meses.

Ao meu amigo Davi e sua família Dona Valéria e seu Fernando por me acolherem

tão bem em seu lar num momento tão delicado. Eu não tenho como agradecer esse gesto de carinho e nunca me esquecerei de vocês.

Ao meu amigo Emanuel, por ser o protagonista perfeito do universo LABTOX/LBFBC/LABCLIN e ser a enciclopédia para todos os experimentos, não só meus mas de todas as pessoas que passam pelo laboratório.

Aos meus amigos e colegas dos laboratórios LABTOX, LBFBC e LABCLIN, pelo apoio na realização dos trabalhos, pela parceria, pelos momentos de descontração e pelos cafés da tarde ou saídas para karakês duvidosos.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização desse trabalho.

À UFC e à CAPES pelo financiamento desse trabalho e da minha formação como pesquisador.

RESUMO

O estresse oxidativo é caracterizado pelo acúmulo intracelular de Espécies Reativas de Oxigênio (ERO), que participam ativamente no desenvolvimento de doenças de natureza inflamatória, cardiovascular, neuropática, óssea, metabólica, infecciosa, entre outras. A curcumina tem sido explorada por seu alto efeito antioxidante, tanto como scavenger, quanto por modulação em vias de sinalização, em especial a via Keap1/Nrf2/ARE. Entretanto, sua baixa solubilidade, estabilidade e farmacocinética em pH fisiológico prejudicam seu uso clínico. Recentemente, um grupo de análogos sintéticos monocarbonilados da curcumina foi sintetizado, visando a obtenção de características melhoradas. Assim, o presente trabalho objetivou avaliar o efeito citoprotetor dos curcuminoïdes sintéticos monocarbonilados (1E,4E)-1,5-difenillpenta-1,4-dien-3-ona (DBA) e (1E,4E)-1,5-bis(4-metoxifenil)penta-1,4-dien-3-ona (DBAn) em modelo de lesão por estresse oxidativo por peróxido de hidrogênio (H₂O₂). Inicialmente, ensaios de docking molecular foram realizados para investigar a interação teórica de curcumina (Cur), DBA e DBAn com os domínios Kelch e Brick-to-Brick (BTB) de Keap1. Em seguida, a citotoxicidade e o efeito protetor dos curcuminoïdes sobre as células expostas ao H₂O₂ foram determinadas pelo ensaio de MTT em macrófagos murinos RAW 264.7. O perfil de morte celular foi analisado por citometria de fluxo usando 7AAD e Anexina V-FITC. Também por citometria, foi avaliado o acúmulo de ERO citoplasmáticas com o marcador DCFH2-DA. Finalmente, a modulação gênica da via Keap1/Nrf2/ARE foi avaliada pela análise da expressão de Nrf2 e HO-1 por RT-qPCR. Os ensaios *in silico* demonstraram que DBA e DBAn interagiram com resíduos importantes do domínio Kelch de Keap1, indicando possível interferência com a sua ligação a Nrf2. No ensaio de MTT, DBA e DBAn apresentaram citotoxicidade inferior à Cur em macrófagos. Além disso, foram capazes de reduzir o efeito citotóxico induzido por H₂O₂ de maneira superior ao observado para Cur. Os curcuminoïdes foram capazes de reduzir os eventos de morte celular causados por H₂O₂, com aumento de células viáveis e redução de células marcadas com 7AAD e duplamente marcadas. Além disso, Cur, DBA e DBAn reduziram o acúmulo citoplasmático de ERO induzido por H₂O₂ nas concentrações testadas. Quanto à expressão gênica, o tratamento com H₂O₂ aumentou a expressão relativa de Nrf2 e HO-1, enquanto os curcuminoïdes causaram redução. Assim, conclui-se que os curcuminoïdes sintéticos DBA e DBAn apresentaram efeito citoprotetor e antioxidante em modelo estresse oxidativo induzido por peróxido, atuando possivelmente como modulador da via de modulação Keap1/Nrf2/ARE. Esses resultados podem auxiliar no desenvolvimento de novas estratégias antioxidantes direcionadas.

Palavras-chave: Curcumina, estresse oxidativo, Nrf2.

ABSTRACT

Oxidative stress is characterized by the intracellular accumulation of Reactive Oxygen Species (ROS), which actively participates in the development of diseases of inflammatory, cardiovascular, neuropathic, bone, metabolic, infectious nature, among others. Curcumin has been explored for its high antioxidant effect, both as a scavenger and for modulation of signaling pathways, especially the Keap1/Nrf2/ARE pathway. However, its low solubility, stability and pharmacokinetics at physiological pH hinder its clinical use. Recently, a group of synthetic monocarbonyl analogues of curcumin was synthesized, aiming to obtain improved characteristics. Thus, the present study aimed to evaluate the cytoprotective effect of the synthetic monocarbonylated curcuminoids (1E,4E)-1,5-diphenylpenta-1,4-dien-3-one (DBA) and (1E,4E)-1,5-bis(4-methoxyphenyl)penta-1,4-dien-3-one (DBAn) in a model of oxidative stress injury by hydrogen peroxide (H₂O₂). Initially, molecular docking assays were performed to investigate the theoretical interaction of curcumin (Cur), DBA, and DBAn with both Kelch and Brick-to-Brick (BTB) domains of Keap1. Then, the cytotoxicity and protective effect of curcuminoids on cells exposed to H₂O₂ were determined by MTT assay in RAW 264.7 murine macrophages. The cell death profile was analyzed by flow cytometry using 7AAD and Annexin V-FITC. Also by cytometry, the accumulation of cytoplasmic ROS was evaluated with DCFH2-DA. Finally, the gene modulation of the Keap1/Nrf2/ARE pathway was evaluated by analyzing the expression of Nrf2 and HO-1 by RT-qPCR. Molecular docking demonstrated that DBA and DBAn interacted with important residues of Kelch domain of Keap1, indicating possible interference with its binding to Nrf2. In the MTT assay, DBA and DBAn showed lower cytotoxicity than Cur in macrophages. Furthermore, they were able to reduce the cytotoxic effect induced by H₂O₂ in a manner superior to that observed for Cur. Curcuminoids were able to reduce cell death events caused by H₂O₂, with an increase in viable cells and a reduction in cells labeled with 7AAD and double labeled. Furthermore, Cur, DBA and DBAn reduced the cytoplasmic accumulation of ROS induced by H₂O₂ at the tested concentrations. Regarding gene expression, treatment with H₂O₂ increased the relative expression of Nrf2 and HO-1, while curcuminoids caused a reduction on this effect. Thus, the synthetic curcuminoids DBA and DBAn showed cytoprotective and antioxidant effects in a peroxide-induced oxidative stress model, possibly acting as Keap1/Nrf2/ARE pathway modulator. These results may contribute for the development of new targeted antioxidant strategies.

Keywords: Curcumin, Oxidative stress, Nrf2

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

7AAD - 7-aminoactinomicina

Ax- Anexina V

BDMC- Bisdesmetoxicurcumina

CO- Monóxido de Carbono

CUR- Curcumina

DBA- (1E,4E)-1,5-difenillpenta-1,4-dien-3-ona

DBAn- (1E,4E)-1,5-bis(4-metoxifenil)penta-1,4-dien-3-ona

DCF- 2',7'-diclorofluoresceína oxidado

DCF-DA- 2',7'-diacetato de diclorofluoresceína

DCFH- 2',7'-diclorofluoresceína

DMC- Desmetoxicurcumina

DMEM- *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

DMSO- Dimetilsulfóxido

DNA- Ácido Desoxirribonucleico

DTNB- Ácido 5,5-ditiobis-2-nitrobenzóico

ERO- Espécies Reativas de Oxigênio

Fe²⁺- Íon ferroso

FL- Leitor de Fluorescência

GCLC- Glutationa-Cisteína Ligase (Subunidade catalítica)

GCLM- Glutationa-Cisteína Ligase (Subunidade moduladora)

GSH- Glutationa Reduzida

GSSG- Glutationa Oxidada

H₂O₂- Peróxido de Hidrogênio

HDL- Lipoproteína de Alta Densidade

HO-1- Hemeoxigenase-1

KEAP1- *Kelch-like ECH-associated protein 1*

LDL- Lipoproteína de Baixa Densidade

LDL-ox- Lipoproteína de Baixa Densidade Oxidada

MTT- Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio

NAC- N-Acetylciesteína

NADPH- Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato Hidrogênio

NRF2- Fator de Transcrição Nuclear Eritroide 2

Rho123- Rhodamina 123

RNAm- Ácido Ribonucleioco Mensageniro

SOD- Superóxido Dismutase

TBARS- Substâncias reativas ao Ácido Tiobarbitúrico

TCA- Ácido tricloroacético

Tris- Tri-hidroximetil-aminometano

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Mecanismo de Regulação de GSH
- Figura 2.** Mecanismo de regulação Keap1/Nrf2
- Figura 3.** Estrutura química da curcumina (Formas cetônica e enólica)
- Figura 4.** Subdivisão da estrutura da curcumina
- Figura 5.** Estrutura química dos curcuminoides sintéticos
- Figura 6.** Delineamento experimental do ensaio de citotoxicidade
- Figura 7.** Linha do tempo do experimento de avaliação do efeito sobre citotoxicidade induzida por H₂O₂
- Figura 8.** Representação da citometria de fluxo
- Figura 9.** Determinação do perfil de morte celular através de 7-AAD/Anx
- Figura 10.** Determinação de ERO através de DCF
- Figura 11.** Docking dos curcuminoides com o domínio Kelch
- Figura 12.** Docking dos curcuminoides com o domínio BTB
- Figura 13.** Citotoxicidade dos curcuminoides
- Figura 14.** Determinação do efeito citotóxico de peróxido de hidrogênio em macrófagos RAW264.7
- Figura 15.** Efeito dos curcuminoides sobre estresse oxidativo induzido por macrófagos
- Figura 16.** Eventos de morte celular em macrófagos tratados com curcumina submetidos à lesão por peróxido de hidrogênio (H₂O₂)
- Figura 17.** Eventos de morte celular em macrófagos tratados com DBA submetidos à lesão por peróxido de hidrogênio (H₂O₂)
- Figura 18.** Eventos de morte celular em macrófagos tratados com DBAn submetidos à lesão por peróxido de hidrogênio (H₂O₂)
- Figura 19.** Efeito dos curcuminoides sobre o acúmulo citoplasmático de ERO
- Figura 20.** Expressão relativa de mRNA

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Sequências dos primes

Tabela 2. *Docking* dos curcuminóides com o domínio Kelch

Tabela 3. *Docking* dos curcuminóides com o domínio Kelch

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	17
1.1 Estresse Oxidativo.....	17
1.2 Doenças Associadas ao Estresse Oxidativo	17
1.3 Homeostase Redox.....	19
1.4 Uso de terapias antioxidantes	21
1.5 Curcumina	23
1.6 Curcuminoides sintéticos	24
2 OBJETIVOS.....	30
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	32
3.1 Obtenção das moléculas.....	32
3.2 Avaliação <i>in silico</i>	32
3.3 Obtenção e manutenção das células.....	33
3.4 Ensaios de Citotoxicidade	33
3.5 Avaliação do efeito citoprotetor dos curcuminoides sobre a citotoxicidade induzida por H ₂ O ₂	35
3.6 Ensaios de Citometria de Fluxo	35
3.7 Análise da expressão gênica	39
3.8 Análise estatística	40
4 RESULTADOS	42
4.1 Docking molecular	42
4.2 Citotoxicidade	45
4.3 Estresse oxidativo induzido por peróxido de hidrogênio	46
4.4 Perfil de morte celular	48
4.5 Acúmulo de ERO citoplasmático	51
4.6 Ensaios de Biologia Molecular	54
5 DISCUSSÃO	57
6 CONCLUSÃO	66
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS	68
REFERÊNCIAS	70

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 Estresse Oxidativo

O estresse oxidativo é um conjunto de processos que culminam no aumento de Espécies Reativas de Oxigênio (ERO), classificados em Radicais Livres, quando há elétrons não pareados tais como o Ânion Radical Superóxido e Não Radicais Livres como o Peróxido de Hidrogênio (H_2O_2), ou na diminuição das entidades antioxidantes endógenas (Hassan; Ahmed; Hassan, 2024; Kontoghiorghe; Kontoghiorghe, 2019).

A alta reatividade das ERO é essencial à manifestação da função de diversas células como nos mecanismos de morte celular programada e na defesa contra agentes infecciosos pelas células imunológicas; porém o desequilíbrio em suas concentrações pode causar o rompimento da fita de Ácido Desoxirribonucleico (DNA) e a desnaturação de outras macromoléculas celulares como proteínas e lipídeos que, sem o devido reparo resultam na morte celular (Forman; Zhang, 2021b).

1.2 Doenças Associadas ao Estresse Oxidativo

Pela inespecificidade do dano celular das ERO, a lesão tecidual causada pelo estresse oxidativo apresenta um amplo painel de alvos no organismo, estando envolvida em diversos mecanismos patogênicos que atingem vários sistemas orgânicos. O estresse oxidativo participaativamente no desenvolvimento de doenças de natureza inflamatória, cardiovasculares, neuropáticas, ósseas, metabólicas, infecciosas, entre outras. Adicionalmente, a relação causa-efeito também pode ser invertida, onde condições patológicas resultam em indução de estresse oxidativo no microambiente tecidual e/ou sistêmico (Beavers; Skaar, 2016; Jain et al., 2024; Kim, So Hyung et al., 2008; Perrone et al., 2023).

Na doença de Parkinson, por exemplo, o estresse oxidativo nos neurônios dopaminérgicos é responsável por grande parte da lesão celular neuronal estando envolvido tanto no desenvolvimento quanto nas complicações da doença (Adams, 2021; Zhang, Hantao et al., 2022). No desenvolvimento e progressão de neoplasias, o estresse oxidativo pode participar principalmente lesando os ácidos nucleicos podendo gerar falhas

replicativas (Jelic et al., 2021; Klaunig, 2018).

Além disso, também é descrito que as ERO são capazes de estimular a ativação da via PI3K/MAPK reduzindo a expressão e atividade de eNOS e, consequentemente, a disponibilidade vascular de NO (Óxido Nítrico), aumentando a pressão arterial (Reckelhoff; Romero; Yanes Cardozo, 2019a; Zhang, Zenglei et al., 2023). Já nas doenças infecciosas, a produção de ERO em resposta à infecção pode causar dano tecidual ao órgão infectado aumentando a susceptibilidade desse tecido (Alam, Mohammad Shah; Czajkowsky, 2022; Ivanov; Bartosch; Isagulants, 2017).

Dentre as doenças relacionadas ao estresse oxidativo, destacam-se as de caráter metabólico. No diabetes *mellitus*, por exemplo, a produção de ERO induzida pelo estado hiperglicêmico sustentado participaativamente da progressão das complicações associadas ao diabetes, através de estresse oxidativo nas células β-pancreáticas e no endotélio vascular. Esse mecanismo está associado à redução da síntese endógena de insulina em pacientes com diabetes tipo 2, bem como a alterações macro e microvasculares características da doença, como nefropatia, neuropatia e retinopatia diabéticas (Chaudhary et al., 2023; Senoner; Dichtl, 2019; Teleanu et al., 2022a).

O dano endotelial causado pelo estresse oxidativo também participa do desenvolvimento e progressão da aterosclerose, representada na Figura 1, uma inflamação vascular crônica resultante de microlesões endoteliais associadas ao excesso de Lipoproteína de Baixa Densidade (LDL) oxidada (Incalza et al., 2018; Shaito et al., 2022). As partículas LDL-ox se depositam no microambiente da lesão endotelial, ativando resposta inflamatória mediada principalmente por macrófagos que, sem sucesso, perdem sua morfologia natural pelo acúmulo de gotículas de lipídio no citoplasma, adquirindo uma forma denominada célula espumosa (Chistiakov et al., 2017; Luo et al., 2017). As células espumosas, por sua vez, liberam citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento que causam a formação de uma capa fibrótica para isolamento do microambiente, reduzindo a luz do vaso e, consequentemente a irrigação sanguínea nos tecidos posteriores (Fan; Watanabe, 2022; Kattoor et al., 2017).

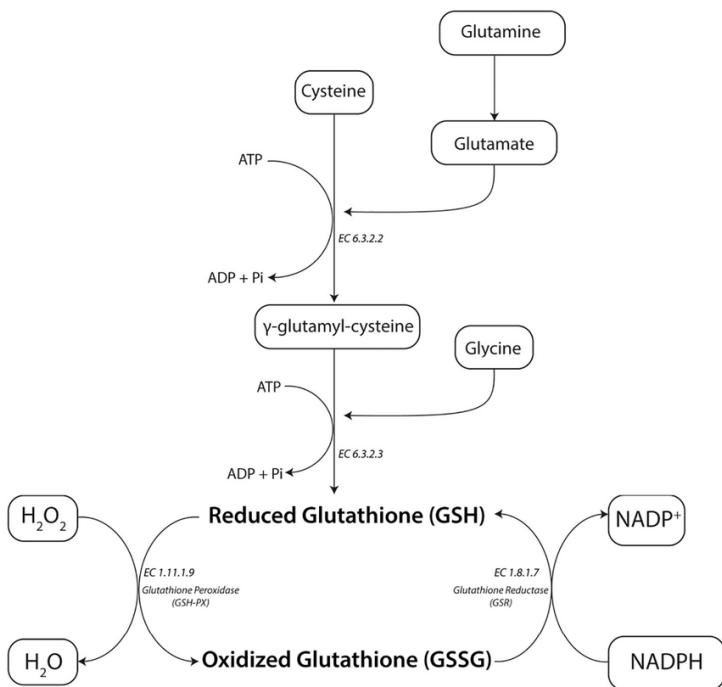
O processo de aterogênese é lento e multifatorial, tendo interferências de vários aspectos. A literatura científica aponta que pacientes que já apresentam doenças crônicas como Diabetes Mellitus e Hipertensão Arterial Sistêmica, apresentam partículas de LDL menores e mais oxidáveis, facilitando o início do desenvolvimento da aterosclerose pois necessitam de uma lesão endotelial menor. Alterações no metabolismo das lipoproteínas também estão associadas ao maior risco de desenvolvimento de aterosclerose, pois podem aumentar a quantidade de LDL em reação à Lipoproteína de Alta Densidade (HDL), que apresenta papel antiaterogênico ao exercer o transporte reverso do colesterol, retirando-o da LDL (Cervantes et al., 2024; Kaplan; Aviram; Hayek, 2012; Mahdinia et al., 2023; Poznyak et al., 2020).

1.3 Homeostase Redox

Os mecanismos fisiológicos de balanço do estresse oxidativo são responsáveis por controlar o acúmulo de espécies reativas de oxigênio, mantendo um microambiente tecidual regulado. A natureza da ação desses antioxidantes pode variar desde uma ação Scavenger, na qual há uma inibição direta das ERO, como ocorre com o Ácido Ascórbico e os Carotenóides, ou enzimática, como no caso da Catalase, Peroxidase e Glutationa redutase/oxidase. Adicionalmente, existem mecanismos moleculares dependentes de transcrição gênica que tem por objetivo a manutenção de um ambiente redox, por meio da alteração da expressão de enzimas antioxidantes, como a Heme Oxigenase e Glutationa Redutase (Forman; Zhang, 2021b, a; Teleanu et al., 2022b).

A Glutationa reduzida (GSH) é um tripeptídeo composto de Glutationa, Cisteína e Glicina e apresenta a capacidade de neutralizar radicais livres, incluindo peróxido de hidrogênio. No processo de neutralização, ocorre uma ligação entre duas moléculas de GSH através de pontes dissulfeto entre a Cisteína de cada uma, formando a Glutationa oxidada (GSSG). Enzimas como a Glutationa Peroxidase e Glutationa oxidase são responsáveis por esse processo. A GSSG pode ser restaurada a GSH pela ação da Glutationa Redutase, processo no qual o NADPH é usado como coenzima. Processos que afetam a homeostase redox, provocam desequilíbrio nas concentrações de GSH, diminuindo-o em detrimento da GSSG (Figura 2). Nesse contexto, um bom marcador para o equilíbrio redox é a razão GSH/GSSG (Aoyama; Watabe; Nakaki, 2008; Asantewaa; Harris, 2021; Averill-Bates, 2023).

Figura 1. Mecanismo de Regulação de GSH.



Legenda: Na presença de energia (ATP) e γ -glutamilcisteína sintetase, cisteína e glutamato são usados para produzir γ -glutamilcisteína. O GSH é então formado usando uma segunda molécula de ATP e glutationa sintetase. Na presença de radicais, o GSH é oxidado a GSSG via glutationa peroxidase. GSSG pode então ser reduzido de volta a GSH pela glutationa redutase usando NADPH.

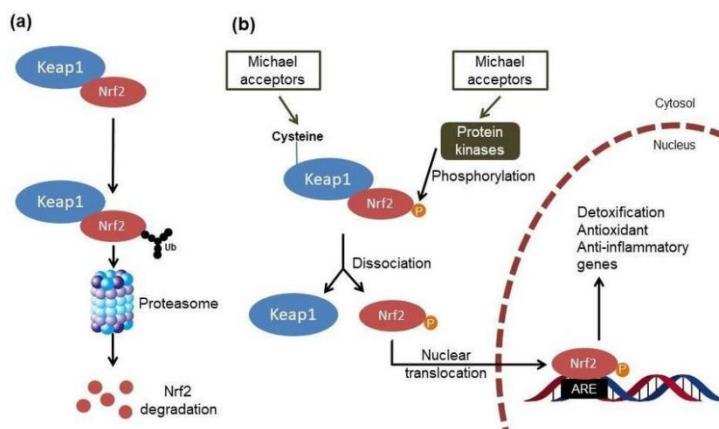
Fonte: Burgos et al., 2017

A desregulação de GSH é um mecanismo amplamente estudado em doenças relacionadas ao estresse oxidativo. Alterações nos níveis de GSH/GSSG são responsáveis por piores prognósticos em diversas doenças como em doenças neurodegenerativas, neoplasias e fibrose cística (Ballatori et al., 2009; Johnson; Wilson-Delfosse; Mieyal, 2012; Ke et al., 2022). Moléculas antioxidantes como a Coenzima Q10, Resveratrol, Naringenina, bem como análogos da própria Glutationa são capazes de reverter ou diminuir esse desbalanço (Dhanisha et al., 2022; Wu; Batist, 2013; Xu et al., 2024).

Apesar das aplicabilidades de mecanismos antioxidantas como da GSH, o principal mecanismo fisiológico de combate ao estresse oxidativo é mediado pelo Fator de Transcrição Nuclear Eritroide 2 (Nrf2). Em estado de homeostase, o nrf2 encontra-se ubiquitinado com a *Kelch-like ECH-associated protein 1* (KEAP1), que regula sua expressão e ativa mecanismos de degradação dependentes de proteassoma. Durante estresse oxidativo, o aumento da concentração de ERO induz o desacoplamento de Nrf2 e KEAP1

(Figura 3), aumentando a concentração citoplasmática de Nrf2 e sua translocação para o núcleo, onde irá induzir a expressão gênica de proteínas antioxidantes, sendo uma das principais a Hemeoxigenase-1 (HO1) (Baird; Yamamoto, 2020; Ulasov et al., 2022; Yamamoto; Kensler; Motohashi, 2018; Yu; Xiao, 2021).

Figura 2. Mecanismo de regulação Keap1/Nrf2



Legenda: Nrf2: fator 2 relacionado ao fator nuclear eritróide 2; Keap1: proteína 1 associada a ECH tipo Kelch; ARE: elemento de resposta antioxidante; Ub: ubiquitina; P: fosfato.

Fonte: (Silva, Matheus de Freitas et al., 2018)

A Hemeoxigenase catalisa a degradação do grupo heme da hemoglobina, gerando Ión Ferroso (Fe^{2+}), Biliverdina e Monóxido de Carbono (CO). O CO liberado por essa reação atua como vasodilatador e anti-inflamatório enquanto a Biliverdina apresenta elevado potencial antioxidante. Além do seu efeito anti-inflamatório e imunossupressor (Bekyarova et al., 2023; Lu, Chia Wen et al., 2023).

1.4 Uso de terapias antioxidantes

Na prática clínica, a terapia farmacológica consiste em mimetizar agente antioxidantes fisiológicos. A administração de vitaminas antioxidantes é uma das primeiras linhas terapêuticas para desequilíbrios redox. São usadas, principalmente, as vitaminas C (ácido ascórbico) e E (tocoferol). O principal mecanismo dessas vitaminas é a inibição scavenger de espécies reativas de oxigênio, diferenciando-se quanto à solubilidade. O ácido ascórbico possui caráter hidrofílico e atura principalmente a nível vascular, enquanto

o tocoferol, lipofílico, possui maior ação antioxidante nas membranas celulares (Ahmad, Khalil Ali et al., 2017; Coombes; Fassett, 2012; Lovat; Preiser, 2003).

Alguns minerais como Selênio e Zinco também são utilizados pelo seu potencial antioxidante. Ambos os metais, atuam como cofatores de enzimas que participam da manutenção da homeostase redox, sendo o Selênio cofator da enzima Glutationa peroxidase enquanto o Zinco é da enzima Superóxido Dismutase (SOD) que catalisa a conversão de íons superóxido em peróxido de hidrogênio (Bjørklund et al., 2022; Huang et al., 2022; Maywald; Rink, 2022).

A N-Acetilcisteína (NAC) atua de maneira mista no controle do estresse oxidativo. Sua ação se deve ao seu efeito scavenger, inibindo diretamente as espécies reativas de oxigênio, além de atuar como um precursor da glutationa, sendo a doadora de cisteína (Chiew; Buckley, 2021; Mackowiak et al., 2024).

A terapia antioxidant é utilizada em diversas condições, desde doenças metabólicas como o Diabetes mellitus, até em doenças neurodegenerativas como Alzheimer e Parkinson e neoplásicas. Os fármacos antioxidantes atuam como adjuvantes na terapia dessa doenças diminuindo o estresse oxidativo associado ao seu desenvolvimento. Além disso, em algumas intoxicações também se faz necessário o uso de fármacos antioxidantes como o uso da NAC nas intoxicações por paracetamol e álcool, do Ácido Alfa-Lipóico e Glutationa nas intoxicações por metais pesados e do Tocoferol como adjuvante no tratamento das intoxicações por inseticidas organofosforados .

Entretanto, as principais ferramentas farmacológicas disponíveis como antioxidantes atualmente atuam exclusivamente como *Scavenger*, ou seja, inibem diretamente as ERO já produzidas no estresse oxidativo, não afetando seu desenvolvimento ou progressão. Uma vez saturados, esses fármacos perdem o efeito no microambiente e o estresse oxidativo continua a se desenvolver. Faz-se necessário, portanto, opções farmacológicas capazes de interferir em vias moleculares relevantes do processo de desenvolvimento do estresse oxidativo (Ahmad, Khalil Ali et al., 2017; Coombes; Fassett, 2012).

Recentemente, novas abordagens farmacológicas tem sido estudadas e desenvolvidas, incluindo o uso de moléculas que interfiram na via Nrf2. Um desses casos é o resveratrol, molécula polifenólica isolada das sementes da uva que atua no alvo chave da resposta antioxidante, o Nrf2, aumentando principalmente a expressão de Hemeoxigenase-1 e Glutationa Redutase. É descrita na literatura científica ação

semelhante nos compostos derivados da Cúrcuma como a Curcumina (Shin et al., 2020; Yang, Chunkun et al., 2024).

1.5 Curcumina

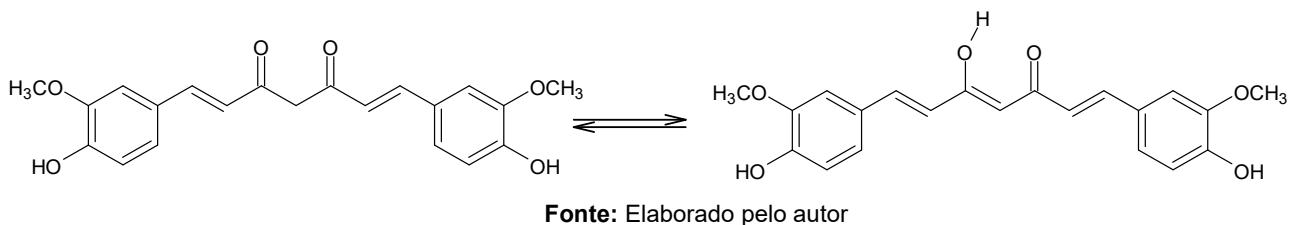
Desde a antiguidade, as plantas medicinais são utilizadas com objetivos terapêuticos pelos mais diversos povos. Entretanto, o estudo para além do empírico teve início somente no século XIX quando se passou a isolar e caracterizar as substâncias químicas com o intuito de obter-se novos fármacos e descobrir novos princípios ativos (Farhat et al., 2023).

Dentre as diversas plantas conhecidas e utilizadas para fins medicamentosos, a cúrcuma (*Curcuma longa*) recebe destaque por ser utilizada na medicina Ayurveda de origem indiana, por suas “ações digestivas, como carminativo, imunizante, antialérgico, antimicrobiano, estimulante, anti-inflamatório, cicatrizante, antioxidante”. Ademais, artigos também apontam o papel hepato, nefro e cardioprotetor, bem como supressor de trombose, hipoglicemiante e antirreumático que já são bem reconhecidos cientificamente (Kocaadam; Şanlier, 2017; Kotha; Luthria, 2019).

Os efeitos biológicos atribuídos à cúrcuma são provenientes da curcumina, um polifenol hidrofóbico, que corresponde a principal substância química que compõe as raízes dessa planta. A curcumina é comercialmente vendida em diversas formas farmacêuticas (cremes, cápsulas, pomadas etc.) que costumam conter curcumina (CUR, ~77%); desmetoxicurcumina (DMC, ~17%); e bisdesmetoxicurcumina (BDMC, ~3%), muito embora sua principal empregabilidade ainda seja na culinária como especiaria (Mosley; Liotta; Snyder, 2007).

Em relação a sua estrutura química, a curcumina é formada por dois anéis metoxifenóis unidos em conjugação por uma β-dicetona, existindo em equilíbrio com sua forma enol tautomérica, como ilustrado na figura 4 (Bhatia et al., 2015; Mosley; Liotta; Snyder, 2007).

Figura 3. Representação estrutural da curcumina (Formas cetônica e enólica)



Fonte: Elaborado pelo autor

Estudos sugerem que a curcumina tem a capacidade de interagir e atuar na regulação de múltiplos componentes da sinalização celular, daí o interesse da comunidade científica em melhor compreender a bioquímica dessa molécula tão promissora. A interação da curcumina com seus alvos biológicos tem sido atribuída à ligação flexível que conecta seus dois anéis metoxifenóis, permitindo que a molécula se forme em distintas conformações facilitando, assim, a ligação com o sítio-alvo (Arshad et al., 2017; Bhandari et al., 2023; Tomeh; Hadianamrei; Zhao, 2019).

Isto posto, os diversos estudos conduzidos acerca da eficácia da curcumina concluem também que seu uso é seguro, mesmo em doses elevadas, o que incentiva as constantes pesquisas sobre a molécula nas últimas décadas. Em contrapartida, a baixa disponibilidade e instabilidade da curcumina *in vivo* revelou-se um obstáculo para que sua utilização como agente terapêutico seja consolidada, limitando a eficácia (Tomeh; Hadianamrei; Zhao, 2019).

Os problemas acerca da biodisponibilidade deste polifenol derivam de sua má absorção e metabolismo e excreção rápidos, além de sua pouca solubilidade em solventes aquosos. Por ser uma molécula hidrofóbica, sua absorção por via oral é dificultada e a existência de sítios suscetíveis a biotransformação acaba resultando em pouca biodisponibilidade devido ao metabolismo de primeira passagem (Abd El-Hack et al., 2021; Anand et al., 2007).

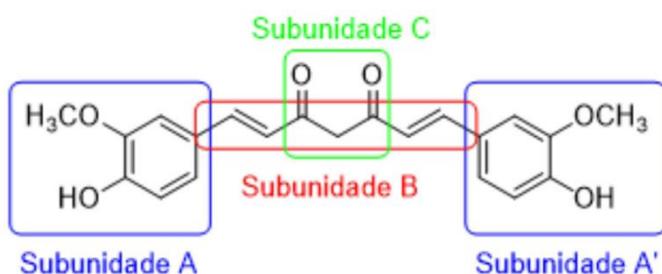
1.6 Curcuminoides sintéticos

Visando contornar tal adversidade, a literatura científica sugere estratégias que vão desde o uso de adjuvantes a fim de retardar seu metabolismo no organismo até o uso de nanopartículas e lipossomas e, por fim, a manipulação de sua estrutura molecular, produzindo derivados sintéticos de melhor biodisponibilidade (Chainoglou; Hadjipavlou-

Litina, 2020; Mosley; Liotta; Snyder, 2007).

Nesse sentido, a curcumina (Figura 5) tem sido estudada quanto a sua relação atividade/estrutura, e muitos pesquisadores se utilizam de seus derivados para conduzir estudos a fim de encontrar uma molécula capaz de atingir seu potencial terapêutico mantendo ao mesmo tempo uma adequada biodisponibilidade e estabilidade in vivo.

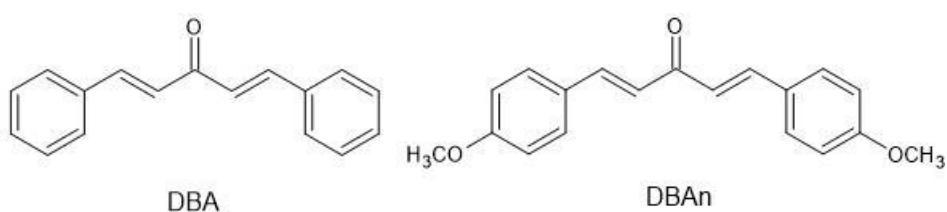
Figura 4. Subdivisão da estrutura da curcumina



Fonte: (Sueth-Santiago et al., 2015)

Como exemplos de derivados obtidos a partir de modificações na estrutura molecular tem-se a tetrahidrocircumina, a classe das chalconas, diarilpentanoides, e o isoxazol. A tetrahidrocircumina mostrou-se mais antioxidante que a curcumina, uma vez que sua estrutura permite a rearranjo em mais conformações do que sua molécula de origem. As chalconas, por sua vez, apresentam maior estabilidade pois, para obtenção da nova estrutura, foram suprimidos dois sítios suscetíveis ao acesso pelo sistema microssomal responsável pelo metabolismo (Figuras 5 e 6) (Ahmad, Iftikhar et al., 2024; Khorasani et al., 2019; Oliveira, Sara et al., 2020).

Figura 5. Estrutura química dos curcuminoïdes sintéticos



Fonte: Elaborado pelo autor

JUSTIFICATIVA

O Estresse oxidativo está associado ao desenvolvimento e progressão de diversas doenças, muitas delas de alta prevalência como doenças crônicas não transmissíveis dentre elas doenças Cardiovasculares e Diabetes Mellitus. Pelo papel fundamental nas complicações dessa doenças, faz-se necessário o desenvolvimento de opções farmacológicas viáveis e eficazes para a terapia antioxidant.

A curcumina é uma molécula com diversas bioatividades descritas, dentre eles o efeito antidiabético e hipolipemiante. Apesar disso, possui características físico-químicas que limitam seu uso em modelos animais e clínicos, como sua baixa biodisponibilidade e degradação em pH fisiológico. Dessa forma, alguns derivados sintéticos com estrutura relacionada aos curcuminoides naturais têm sido desenvolvidos, com o objetivo de melhorar as características físico-químicas com manutenção dos efeitos biológicos de interesse.

Recentemente, foi sintetizada uma série de curcuminoides sintéticos com estabilidade química melhorada em relação às substâncias de origem natural. Os resultados preliminares obtidos com essas substâncias (dados ainda não publicados) indicam efeito antioxidant, antimicrobiano e nefroprotetor. Assim, essas moléculas são candidatos promissores para o desenvolvimento de novos fármacos. No presente trabalho, estudou-se o potencial citoprotetor e antioxidant de dois curcuminoides sintéticos monocarbonilados.

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito citoprotetor e antioxidante dos curcuminoides sintéticos monocarbonilados (1E,4E)-1,5-difenillpenta-1,4-dien-3-ona (DBA) e (1E,4E)-1,5-bis(4-metoxifenil)penta-1,4-dien-3-ona (DBAn) em macrófagos murinos e a participação da via de sinalização *Keap1/Nrf2/ARE*

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a interação teórica dos curcuminoides com os domínios *Kelch* e *Brick-to-Brick* da proteína *Keap1*;
- Analisar a citotoxicidade de DBA e DBAn em macrófagos murinos RAW 264.7;
- Investigar o efeito protetor das moléculas sobre a lesão celular induzida por peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em macrófagos;
- Analisar o acúmulo citoplasmático de ERO induzida por H_2O_2 e o efeito dos curcuminoides;
- Avaliar a capacidade de DBA e DBAn em modular a expressão da via *Keap1/Nrf2/ARE*.

MATERIAIS E MÉTODOS

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Obtenção das moléculas

No presente estudo, foram utilizados dois derivados curcuminoides sintéticos, (1E,4E)-1,5-difenillpenta-1,4-dien-3-ona (DBA) e (1E,4E)-1,5-bis(4-metoxifenil)penta-1,4-dien-3-ona (DBAn), cedidos pelo Laboratório de Síntese Orgânica, da Universidade Estadual do Vale do Acaraú (UVA), coordenado pelo Prof. Dr. Hélcio Silva dos Santos. Síntese foi realizada pelo método de condensação de Claisen-Schmidt (Souza et al., 2024).

3.2 Avaliação *in silico*

A estrutura química das moléculas DBA, DBAn, e Curcumina foram desenhados e os confômeros de menor energia foram salvos em pH fisiológico utilizando o software MarvinSketch (“MarvinSketch and MarvinView: Molecule Applets for the World Wide Web | ChemAxon”, [s.d.]) e otimizados utilizando o software Avogadro (Hanwell et al., 2012), configurado para utilizar algoritmo *steepest* descente com ciclos de 50 interações, aplicando o campo de força MMFF94 (Merck Molecular Force Field) (Batista de Andrade Neto et al., 2021).

Para investigar o mecanismo de ação dos ligantes frente à Keap1, as estruturas dos domínios BTB e Kelch foram obtidas no repositório Protein Data Bank (<https://www.rcsb.org/>) (Berman; Henrick; Nakamura, 2003), PDBs ID: 5DAF (Huerta et al., 2016a) e 4IQK (Marcotte et al., 2013) respectivamente. Na preparação dos alvos foram removidos os resíduos, adicionados os hidrogênios polares, cargas Kollman e cargas Gasteiger (Yan et al., 2014) utilizando o software Autodocktools™ (Huey; Morris; Forli, 2012).

As simulações de docking molecular foram realizadas utilizando o software AutodockVina (Trott; Olson, 2010), Lamarkian Genetic Algorithm (LGA), *Exhaustiveness* 64 (Marinho et al., 2020) e *grid box* envolvendo toda a estrutura dos alvos proteicos utilizando os eixos (-1.696 x, -2.917 y, 18.221 z) e tamanho (126 x, 90 y, 90 z) frente ao BTB domain, eixos (-37.770 x, 0.470 y, -18.084 z) e tamanho (98 x, 96 y, 108 z) frente ao Kelch domain. Foram realizadas 50 simulações gerando 20 poses por simulação e, como critério de seleção da best pose, foi utilizado o parâmetro estatístico RMSD (Root Mean Square Deviation) com valores até 2.0 Å (Yusuf et al., 2008) e energia de afinidade inferior a -6.0

kcal/mol (Shityakov; Förster, 2014; Silva, Jacilene et al., [s.d.]). Para validar as simulações de docking molecular, foi realizada a técnica de redocking, com os inibidores co-cristalizados 58E (BTB domain) e IQK (Kelch domain).

Para analisar os resultados, foram usados os softwares UCSF Chimera™ (Pettersen et al., 2004), Pymol (Schiffelin et al., 2020) e Discovery studio visualizer™ viewer (Dong et al., 2021). As interações moleculares e ligações de hidrogênio foram visualizadas usando o servidor Protein-Ligand Interaction Profiler (PLIP) (Adasme et al., 2021; Salentin et al., 2015).

3.3 Obtenção e manutenção das células

Para a realização dos experimentos de cultivo celular, foi utilizada a linhagem de macrófagos murinos RAW264.7, obtida do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ). As células foram cultivadas em meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) suplementado com Soro Bovino Fetal a 10% e antibióticos em garrafas plásticas estéreis e mantidas a 37 °C em ambiente com 5% de CO₂. Quando confluentes, as culturas foram lavadas, deslocadas e centrifugadas. Em seguida, as células foram contadas em câmara de Neubauer e a densidade celular ajustada para realização dos experimentos.

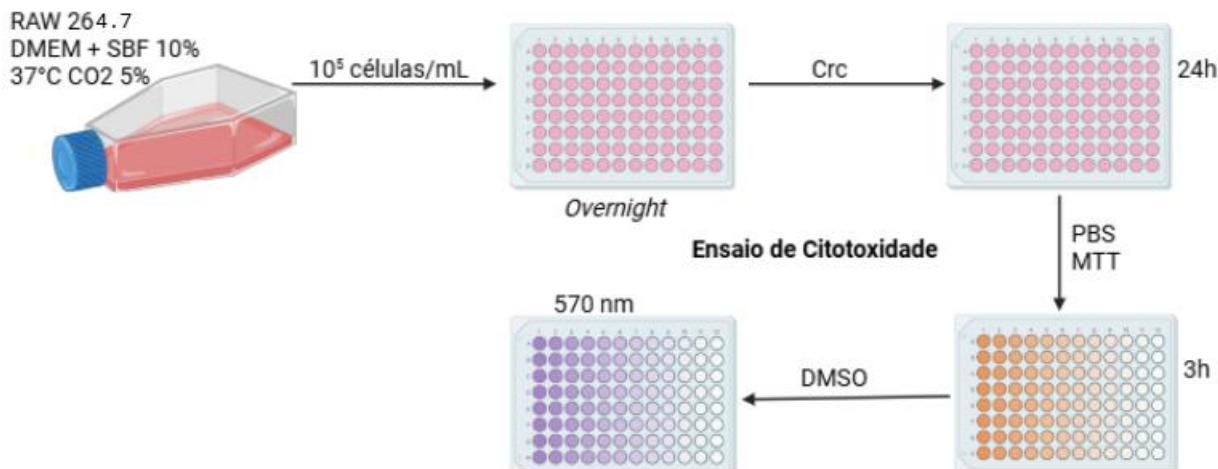
3.4 Ensaio de Citotoxicidade

A toxicidade das moléculas em estudo sobre células RAW264.7 foi avaliada usando o teste do MTT, que avalia a capacidade da célula viável em converter o MTT em um sal de cor arroxeadas chamado formazan (MOSMANN, 1983). 10⁵ células/mL foram adicionadas em placas estéreis de 96 poços e mantidas em estufa *overnight* para adesão e proliferação. Em seguida, foram tratadas com várias concentrações das substâncias em placas de 96 poços por 24 horas (Figura 7). Além de DBA e DBAn, a citotoxicidade da curcumina também foi avaliada para comparação.

Após esse período, os poços foram lavados e tratados com solução de MTT (concentração final de 0,25 mg/mL) por 3 horas. As placas foram então centrifugadas para retirada do sobrenadante e os cristais produzidos foram solubilizados em DMSO (dimetilsulfóxido). A leitura espectrofotométrica foi realizada a 570 nm e o percentual de viabilidade calculado em comparação ao grupo controle. Como controle negativo, foram usadas células tratadas unicamente com veículo (DMSO 0,5%). As concentrações que não

apresentarem citotoxicidade foram utilizadas nos experimentos a seguir.

FIGURA 6: Delineamento experimental do ensaio de citotoxicidade

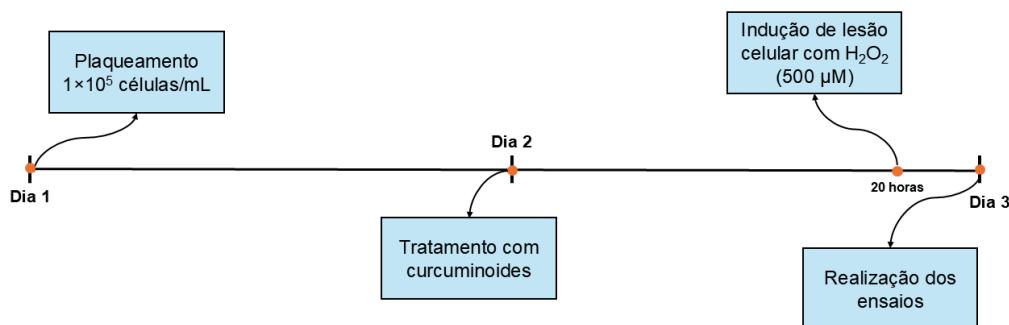


Fonte: Elaborada pelo autor.

Em paralelo, o ensaio de MTT foi realizado também para avaliação da citotoxicidade do peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Para isso, os macrófagos foram tratados com diferentes concentrações de H_2O_2 (1000; 500; 250; 125; 62,5; 31,25 e 15,6 μM) por 4 e 8 horas e, em seguida, submetidos ao ensaio de MTT. Por fim, o percentual de células viáveis foi calculado, e a concentração capaz de reduzir a viabilidade em 50% foi estimada por regressão não-linear.

3.5 Avaliação do efeito citoprotetor dos curcuminoïdes sobre a citotoxicidade induzida por H₂O₂

FIGURA 7: Linha do tempo do experimento de avaliação do efeito sobre citotoxicidade induzida por H₂O₂



Fonte: Elaborada pelo autor

Para avaliar a capacidade de DBA e DBAn em reduzir a lesão celular induzida pelo estresse oxidativo de H₂O₂, as concentrações não tóxicas, conforme ensaio de citotoxicidade, foram utilizadas. 10⁵ células/mL foram cultivadas em placas de 96 poços e mantidas *overnight* para adesão e proliferação. Em seguida, foram tratadas com DBA e DBAn na mesma faixa de concentrações do experimento anterior por 20 horas, seguido da adição de H₂O₂ (500 μM) e incubação por 4 horas adicionais. Após esse período, o ensaio do MTT foi realizado e o percentual de células viáveis foi calculado como descrito nos tópicos anteriores (Lin et al., 2019a). Células não tratadas foram usadas como controle negativo, e células tratadas unicamente com H₂O₂ foram utilizadas como controle de citotoxicidade. Além disso, curcumina também foi usada para permitir comparação com os curcuminoïdes em estudo.

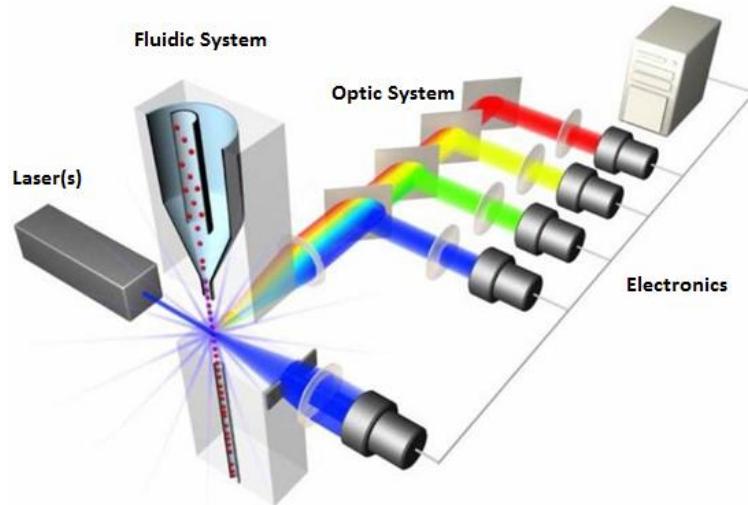
3.6 Ensaios de Citometria de Fluxo

A citometria de fluxo é um método no qual células suspensas são contadas através de leitura fotoelétrica conhecidos como Contadores de Células Ativados por Fluorescência

(FACS). As células são aspiradas e dirigidas por uma corrente de fluxo contínuo de salina, fazendo com que estas passem individualmente pela câmara de leitura, atravessando feixes de luz de comprimento de onda específicos (figura 8). Inicialmente, na câmara de leitura, as células causam obstrução numa corrente de impedância elétrica ou interrupção de um feixe luminoso. Esse evento é proporcional ao tamanho da célula e é chamado de dispersão frontal, ou FSC (*Forward Scatter*) (Adan et al., 2017).

Paralelamente, é gerada pela célula uma dispersão lateral de luz, chamada de *Side Scatter* (SSC), que se deve ao encontro do feixe luminoso com as estruturas intracelulares, como organelas, núcleo e grânulos, permitindo a avaliação da complexidade ou granulosidade celular. Além disso, quando células ou outras partículas são marcadas com fluorocromos, o feixe luminoso provoca a excitação dessas moléculas e consequente emissão de luz detectada em leitores de fluorescência (FL1, FL2, FL3, FL4 e FL5) (Schmit; Klomp; Khan, 2021).

Figura 8. Representação da citometria de fluxo



Fonte: Elite Optoelectronics Co., 2021

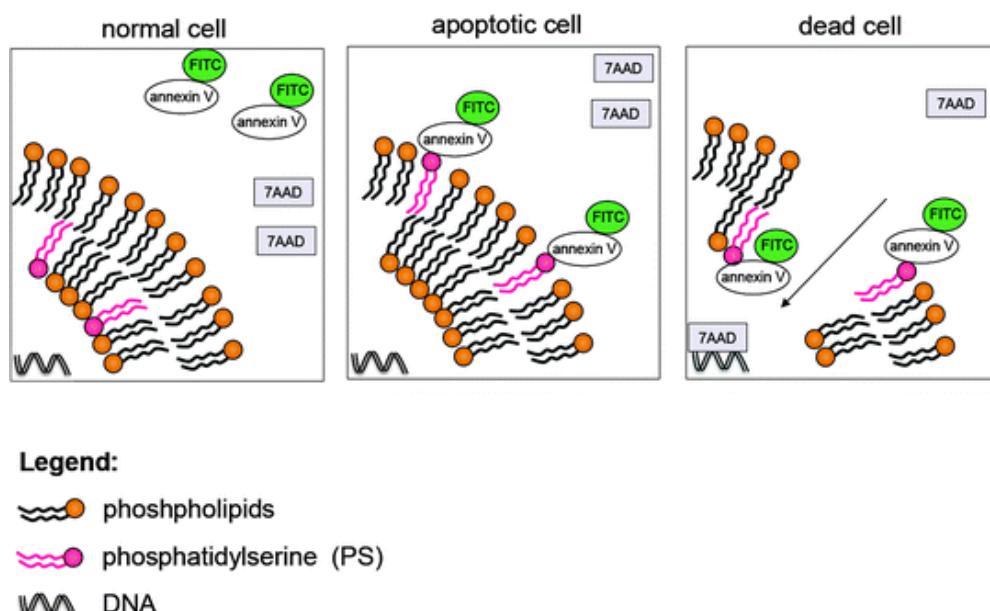
Para realização dos ensaios de citometria de fluxo, 10^5 células/mL foram adicionadas a placas de 6 poços e submetidas ao tratamento com DBA (50 e 25 μM), DBAn (12,5 e 3,12 μM) e Cur (20 e 10 μM) por 20 horas, seguido da lesão celular induzida por H_2O_2 por 4 horas. Após esse período, foram realizados os ensaios a seguir.

3.6.1 Avaliação dos mecanismos de morte celular

Com o objetivo de avaliar o mecanismo pelo qual o estresse oxidativo induzido por peróxido de hidrogênio lesiona e causa amorte das células, foi utilizada a marcação por dois corantes fluorescentes: 7AAD (7-aminoactinomicina) e Anexina V (Anx). O 7AAD é capaz de intercalar-se e complexar-se à molécula de DNA, porém não é capaz de atravessar a membrana intacta da célula, sendo assim, sua marcação ocorre principalmente em processos necróticos. A Anexina V, por sua vez, é uma proteína capaz de ligar-se, na presença de cálcio, à Fosfatidilserina, um fosfolipídio característico da parte interna da membrana plasmática que é externalizado geralmente em processos apoptóticos. Esse mecanismo é demonstrado na Figura 9.

Para realização da análise, as células de cada poço foram retiradas, lavadas e posteriormente suspensas em 100 µL de tampão de ligação; nos tubos foram adicionados 5 µL de 7AAD e 5 µL de Anx (0,5 mg/mL cada). O procedimento foi realizado utilizando um kit comercial (Annexin V PE Apoptosis Detection Kit I, BD Biosciences) e respeitando as orientações do fabricante. Após 15 minutos de incubação no escuro, foi adicionado 400 µL de tampão de ligação em cada tubo e as células foram. Os resultados foram expressos em percentual de células não marcadas; células marcadas por 7AAD, indicativo de necrose; células marcadas por Anexina-V, indicativo de apoptose; e células duplamente marcadas, indicativo de apoptose tardia.

Figura 9. Determinação do perfil de morte celular através de 7-AAD/Anx



Fonte: (Zimmermann; Meyer, 2011)

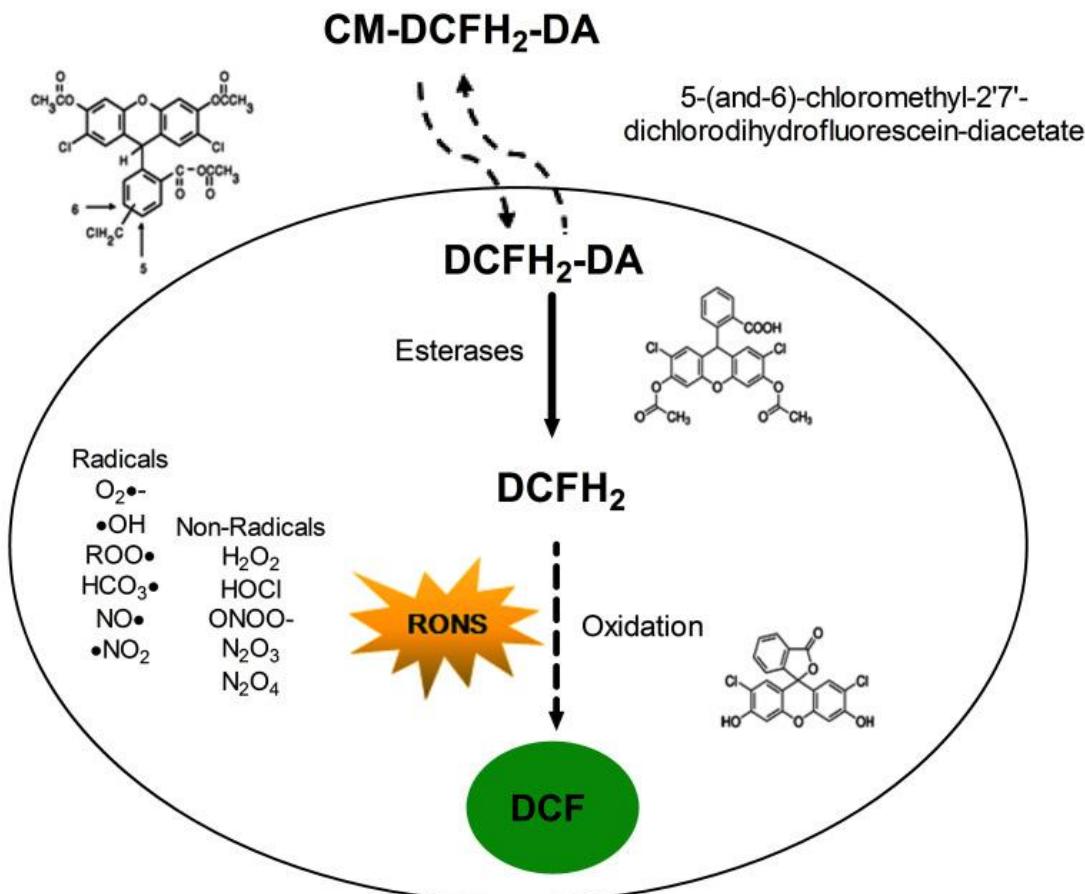
3.6.2 Avaliação da produção citoplasmática de Espécies Reativas de Oxigênio

Nesse ensaio, foi utilizado o 2',7'-diacetato de diclorofluoresceína (DCFH-DA) (Figura 10). O DCFH-DA é uma molécula não-fluorescente e lipofílica, o que lhe confere facilidade de atravessar a membrana plasmática. Algumas enzimas citosólicas promovem a desacetilação do DCFH-DA, formando 2',7'-diclorofluoresceína (DCFH) que fica preso no citoplasma devido à sua alta polaridade. ERO produzidas no citoplasma oxidam o DCFH em DCF (oxidado), fazendo-o apresentar fluorescência verde (Eruslanov; Kusmartsev, 2010).

Três horas após o tratamento com as substâncias, foi adicionada uma solução de DCFH-DA (concentração final de 20 µM em DMSO). Ao final das 24 horas, as células foram retiradas com o auxílio de um *cell scraper*, centrifugadas, lavadas duas vezes com PBS e, por fim, ressuspendidas em 500 µL de solução salina e submetidas à análise por citometria de fluxo (Kim, Hyoncheol; Xue, 2020). A intensidade de fluorescência verde (515 a 545 nm) foi medida, e os grupos experimentais foram comparados pelo cálculo da Intensidade de Fluorescência Relativa (IFR), determinada conforme equação:

$$IFR = \frac{\text{Fluorescência do grupo tratado}}{\text{Fluorescência do grupo controle}}$$

Figura 10. Determinação de ERO através de DCF



Fonte: GLPBIO, 2023

3.7 Análise da expressão gênica

Análises moleculares foram realizadas para avaliar alterações na expressão dos genes de *Nrf2* e *HO-1* após o modelo experimental. Para isso, o RNA total foi extraído, seguido de digestão enzimática de resíduos de DNA usando kit Fast RNA extraction with PureLink RNA Mini Kit (Termofisher). Então, DNA complementar (cDNA) foi sintetizado por reação com transcriptase reversa. O controle do processo foi feito através da análise de concentração e pureza do RNA e do DNA em espectrofotômetro de microvolumes do tipo Nanodrop (CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System – Bio Rad).

A expressão dos genes de interesse foi avaliada por real-time qPCR utilizando mix de reação (SYBR Green Master Mix) e primers específicos sense e antisense (Tabela 1) obtidos comercialmente, usando como referência a base de dados do National Library of Medicine (Jozefczuk; Adjaye, 2011; Sanz et al., 2019). Como gene de referência

(*housekeeping*), foi utilizado *GAPDH*.

Tabela 1. Sequências dos *Primers*

	<i>Primer</i>	Sequência
Nrf2	<i>Forward</i>	ATCTCCTAGTTCTCCGCTGCT
	<i>Reverse</i>	CTCCAAGTCCATCATGCTGAGG
HO-1	<i>Forward</i>	GCCACCAAGGAGGTACACAT
	<i>Reverse</i>	GCTTGTTGCGCTCTATCTCC
GAPDH	<i>Forward</i>	GCTTGTTGCGCTCTATCTCC
	<i>Reverse</i>	GAGTTGCTGTTGAAGTCGCA

Para quantificação, foram criadas curvas padrão usando diluições seriadas de uma amostra com concentração conhecida. O cálculo de eficiência dos primers foi feito através da inclinação da curva padrão. Para análise de dados, foi usado o método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ para quantificação relativa, comparando a expressão do gene de interesse com o gene de referência (Jozefczuk; Adjaye, 2011). Para isso, o valor $\Delta\Delta CT$ será calculado usando a fórmula:

$$\Delta\Delta CT = (Ct_{ap} - Ct_{hp}) - (Ct_{ac} - Ct_{hc})$$

Onde: ΔCT é a diferença entre a quantidade de ciclos de amplificação do gene de interesse e o gene de referência e o $\Delta\Delta CT$ é a diferença entre os ΔCT dos grupos com (ap e hp) e sem (ac e hc) a lesão por Peróxido de Hidrogênio.

3.8 Análise estatística

Todos os experimentos foram realizado pelo menos em triplicata, com n=3 em cada experimento. Os dados foram submetidos ao teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov e expressos como média \pm erro padrão da média. A comparação dos grupos foi feita pelo teste one-way ANOVA com pós-teste de Tukey, utilizando $p < 0,05$ como critério de significância. As análises estatísticas foram realizadas utilizando os programas Microsoft

Excel 365 e GraphPad Prism versão 6.0.

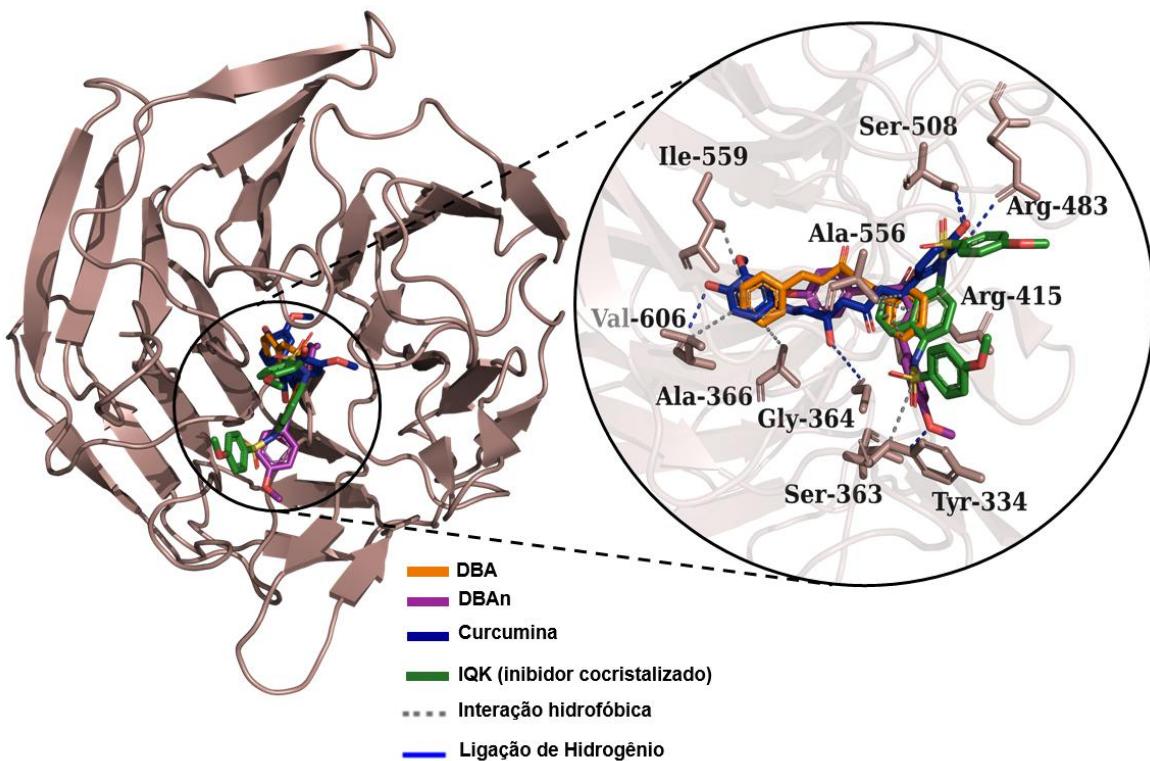
RESULTADOS

4 RESULTADOS

4.1 Docking molecular

No estudo de docking molecular, foram avaliadas as interações teóricas das substâncias em estudo com os domínios *Kelch* e *Brick-to-Brick* (BTB) de Keap1. Os resultados obtidos para o domínio *Kelch* estão apresentadas na figura 11 e tabela 2. O sítio de ligação do inibidor IQK co-cristalizado no domínio *Kelch* é formado pelos resíduos Tyr-525, Ser-508, Ser-555, Ala-556, Asp-530, Arg-483, Arg-415, Ser-602, Tyr-572, Phe-577, Tyr-334 e Phe-478. Tanto curcumina quanto o curcuminoide DBAn se ligaram à mesma região do sítio de ligação do inibidor co-cristalizado, tendo em comum interações com os resíduos Arg-415, Ala-556 e Tyr-334 (DBAn); Arg-415 (DBA); e Arg-415, Ala-556, Arg-483 e Ser-508 (Cur), indicando a possibilidade de esses compostos atuarem de forma similar a IQK. As substâncias em estudo, assim como IQK, realizaram interações do tipo hidrofóbica e ligação de hidrogênio com os resíduos da proteína.

Figura 11. Docking dos curcuminóides com o domínio Kelch



Fonte: Elaborado pelo autor

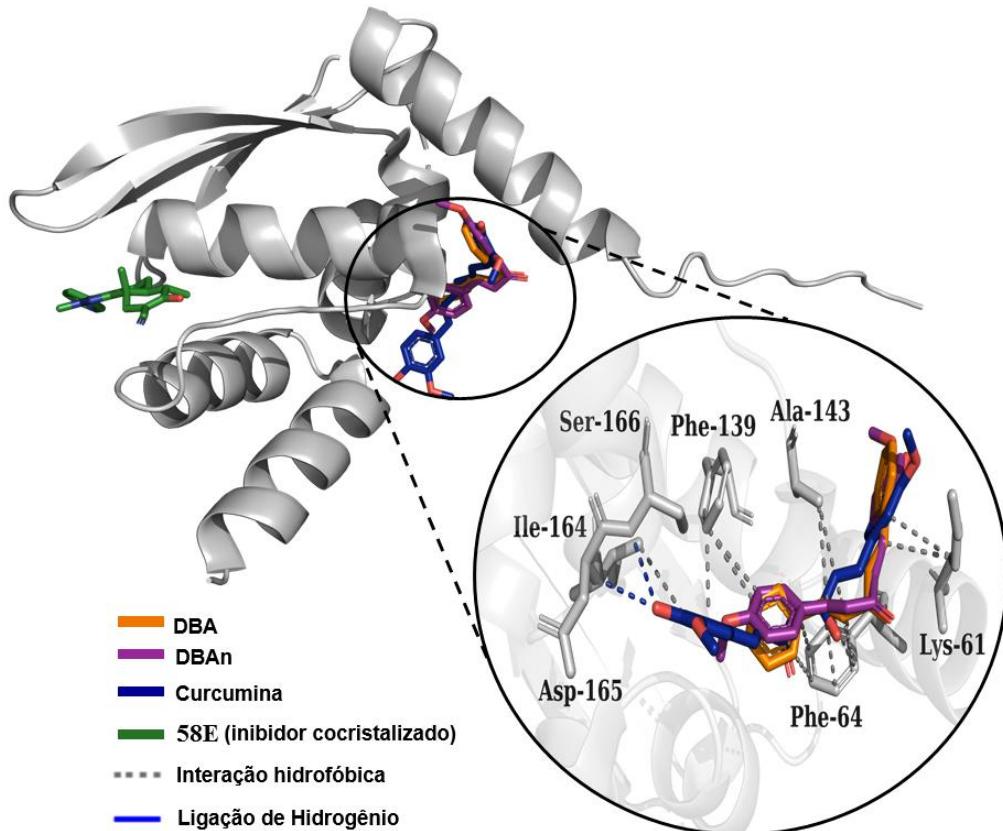
Tabela 2. Docking dos curcuminóides com o domínio Kelch

Ligante	ΔG (Kcal/mol)	RMSD (Å)	Resíduo	Interação	Distância (Å)
DBA	-7,4	0.440	Ala-366A	Hidrofóbica	4.00
			Arg-415A	Hidrofóbica	3.68
			Ala-556A	Hidrofóbica	3.77
			Ile-559A	Hidrofóbica	3.78
DBAn	-7,7	1.034	Tyr-334A	Hidrofóbica	3.93
			Arg-415A	Hidrofóbica	3.62
			Ala-556A	Hidrofóbica	3.72
			Ser-363A	Ligaçāo de Hidrogēnio	2.25
Curcumina	-8,7	1.303	Arg-415A	Hidrofóbica	3.97
			Ala-556A	Hidrofóbica	3.68
			Val-606A	Hidrofóbica	3.98
			Gly-364A	Ligaçāo de Hidrogēnio	3.04
			Arg-483A	Ligaçāo de Hidrogēnio	2.36
			Ser-508A	Ligaçāo de Hidrogēnio	2.46
			Ser-508A	Ligaçāo de Hidrogēnio	2.50
			Val-606A	Ligaçāo de Hidrogēnio	2.34

Legenda: ΔG : Energia Livre de Gibbs; RMSD: *root mean standard deviation*.

Em relação ao domínio BTB, foi observado que DBA, DBAn e curcumina se ligaram à proteína em resíduos diferentes daqueles observados para o inibidor cocristalizado 58E (Figura 12). O sítio de ligação do inibidor co-cristalizado (58E) é formado pelos resíduos Tyr-85, His-129, Val-132, Lys-131, Arg-135, Val-155, Ile-145, Ser-146, Met-147, Gly-148, Lys-150, Cys-151, His-154 (Huerta et al., 2016b). Em contraste, DBA interagiu com Lys-61, Phe-64 e Phe-139; DBAn interagiu com Lys-61, Phe-64, Phe-139 e Ala-143; e curcumina interagiu com Lys-61, Phe-64, Phe-139, Ala-143, Ile-164, Asp-165 e Ser-166 (Tabela 3).

Figura 12. Docking dos curcuminóides com o domínio BTB



Fonte: Elaborado pelo autor

Tabela 3. Docking dos curcuminóides com o domínio BTB

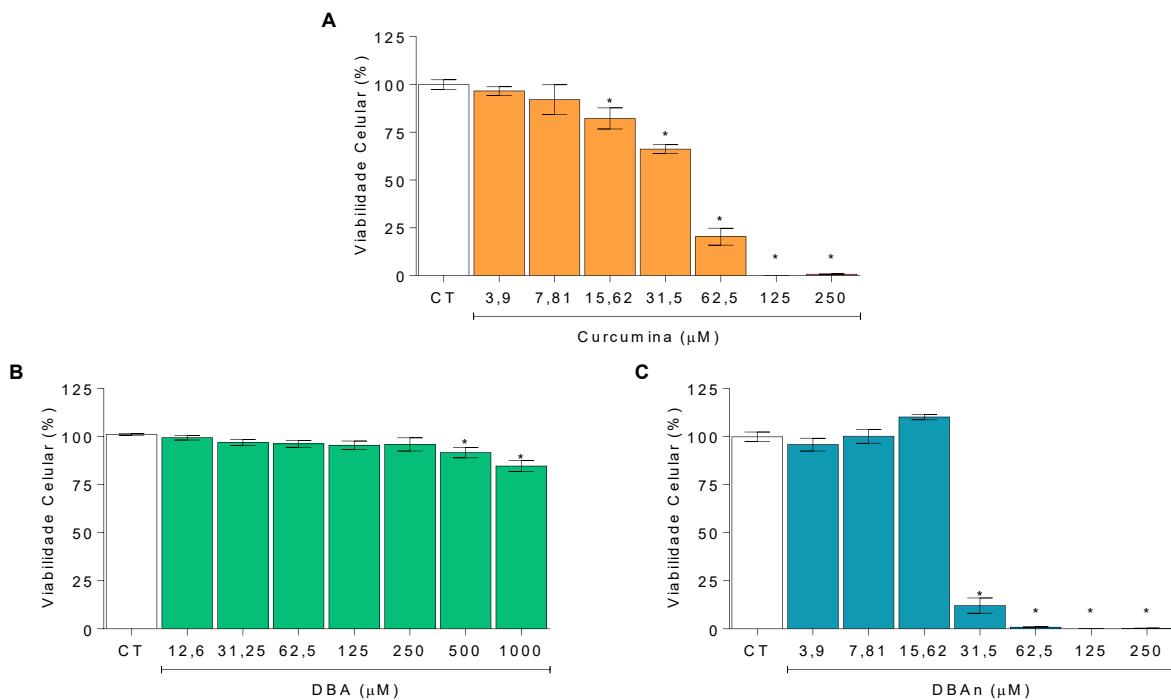
Ligante	ΔG (Kcal/mol)	RMSD (Å)	Resíduo	Interação	Distância (Å)
DBA	-6,7	0.293	Lys-61A	Hidrofóbica	3.79
			Phe-64A	Hidrofóbica	3.65
			Phe-64A	Hidrofóbica	3.86
			Phe-64A	Hidrofóbica	3.91
			Phe-139A	Hidrofóbica	3.76
DBAn	-6,7	0.521	Lys-61A	Hidrofóbica	3.83
			Phe-64A	Hidrofóbica	3.97
			Phe-139A	Hidrofóbica	3.75
			Ala-143A	Hidrofóbica	3.75
Curcumina	-6,2	1.355	Lys-61A	Hidrofóbica	3.84
			Phe-64A	Hidrofóbica	3.16
			Phe-64A	Hidrofóbica	3.64
			Phe-64A	Hidrofóbica	3.78
			Phe-139A	Hidrofóbica	3.60
			Ala-143A	Hidrofóbica	3.17
			Ile-164A	Hidrofóbica	3.77
			Asp-165A	Ligaçao de Hidrogênio	2.83
			Ser-166A	Ligaçao de Hidrogênio	2.21

Legenda: ΔG : Energia Livre de Gibbs; RMSD: *root mean standard deviation*.

4.2 Citotoxicidade

Para a avaliação da toxicidade da curcumina e dos curcuminoides em estudo, foi realizado o ensaio de viabilidade celular, a fim de descobrir as concentrações não tóxicas que serão utilizadas nos ensaios posteriores. A curcumina diminuiu a viabilidade celular a partir da concentração de 7,81 μM enquanto os curcuminoides sintéticos apresentaram toxicidade consideravelmente menor, sendo a DBAn a partir de 31,5 μM e a DBA a partir de 100 μM , conforme mostra a Figura 13. Foram utilizadas nos experimentos posteriores apenas concentrações dentro da faixa não tóxica.

Figura 13. Citotoxicidade dos curcuminóides



Legenda: Dados expressos como média \pm erro padrão médio, analisados com one-way ANOVA com pós-teste de Dunet. * $p<0,05$ vs CT

Fonte: Elaborado pelo autor

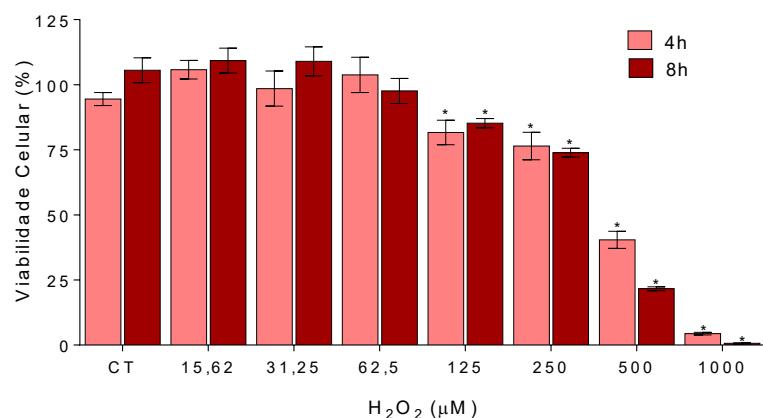
4.3 Estresse oxidativo induzido por peróxido de hidrogênio

A fim de determinar o potencial de proteção da curcumina e os curcuminoides sintéticos, inicialmente foi identificada a toxicidade do peróxido de hidrogênio sobre os macrófagos, para definir tanto a concentração a ser utilizada no experimento quanto o tempo de indução da lesão. Identificou-se que, no tempo de 4 horas a viabilidade celular na concentração de 500 μM foi de, aproximadamente, 50% (Figura 14), ideal para observar o perfil de proteção das substâncias. Com isso, escolheu-se essa concentração e tempo.

Posteriormente, as células foram submetidas à lesão pelo peróxido de hidrogênio na presença das substâncias em estudo. Como pode ser observado na Figura 15, a curcumina foi capaz de prevenir parcialmente a lesão nas concentrações 2,5 μM e 5 μM . Já a DBAn

conseguiu prevenir completamente a lesão nas concentrações 12,5 μM e 6,25 μM e parcialmente na concentração 3,12 μM . A DBA preveniu parcialmente em todas as concentrações testadas.

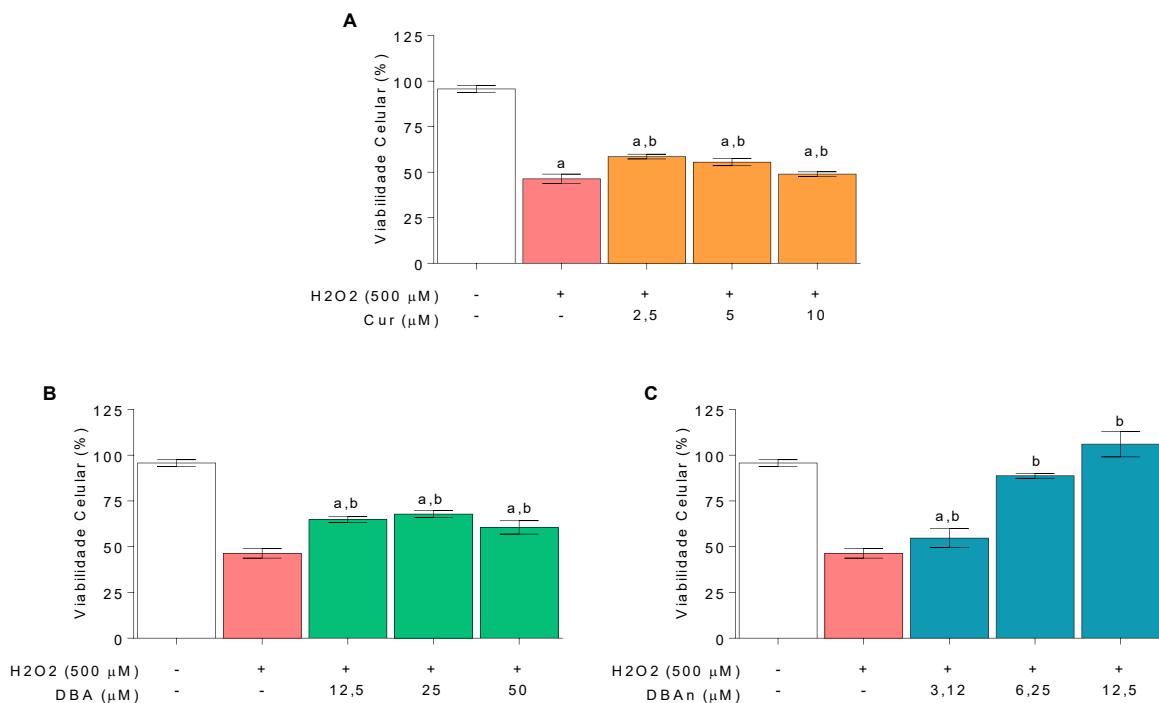
Figura 14. Determinação do efeito citotóxico de peróxido de hidrogênio em macrófagos RAW264.7.



Legenda: Dados expressos como média \pm erro padrão médio, analisados com one-way ANOVA com pós-teste de Dunet. * $p<0,05$ vs CT

Fonte: Elaborado pelo autor

Figura 15. Efeito dos curcuminóides sobre estresse oxidativo induzido por macrófagos



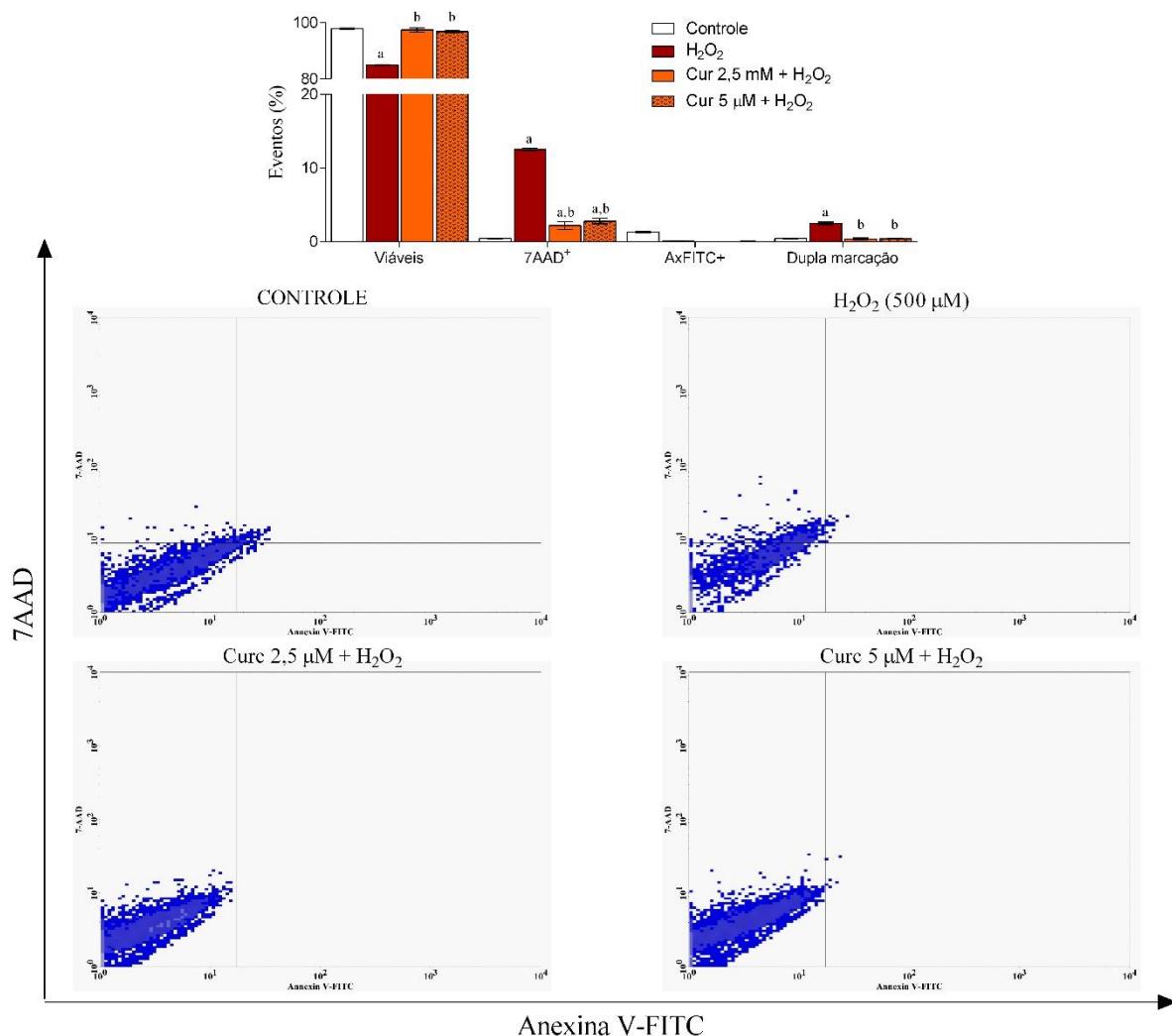
Legenda: Dados expressos como média ± erro padrão médio, analisados com one-way ANOVA com pós-teste de Dunet. *p<0,05 vs CT. ^ap<0,05 vs CT (Branco); ^bp<0,05 vs H₂O₂ (Vermelho)

Fonte: Elaborado pelo autor

4.4 Perfil de morte celular

Para avaliação dos eventos de morte celular relacionados à exposição a H₂O₂ e o efeito protetor dos curcuminoides, foi realizado o ensaio com os marcadores 7AAD e Anexina V-FITC, usando citometria de fluxo. O tratamento com H₂O₂ causou redução do percentual de células viáveis, bem como aumentou o percentual de células marcadas com 7AAD e duplamente marcadas. Esses resultados indicam que o peróxido causou dano e/ou permeabilização da membrana plasmática. O tratamento com curcumina (Figura 16), DBA (Figura 17) e DBAn (Figura 18) conseguiram proteger as células dessas alterações, causando aumento de células viáveis e redução de células marcadas com 7AAD e duplamente marcadas. Adicionalmente, Cur, DBA e DBAn não causaram morte celular ou mudança no percentual de eventos quanto adicionadas isoladamente à cultura (dados não mostrados).

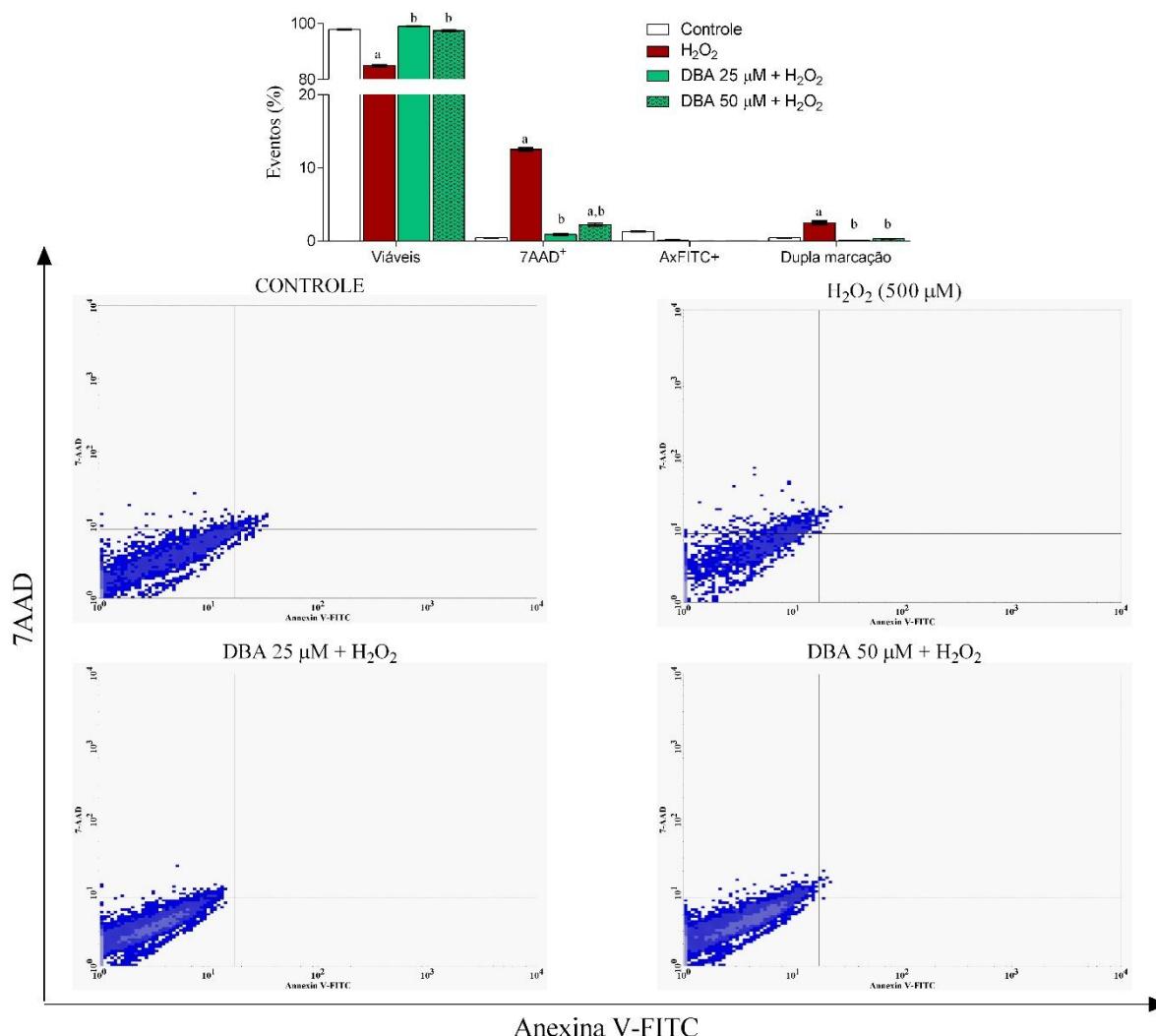
Figura 16. Eventos de morte celular em macrófagos tratados com curcumina submetidos à lesão por peróxido de hidrogênio (H_2O_2).



Legenda: As células foram classificadas como viáveis (não marcadas, quadrante inferior esquerdo), $7AAD^+$ (dano de membrana, quadrante superior esquerdo), $AxFITC^+$ (externalização de fosfatidilserina, quadrante inferior direito) e células duplamente marcadas (quadrante superior direito). Os dados estão expressos como média ± erro padrão médio, e os dados foram analisados com *two-way ANOVA* com pós-teste de Tukey. ^ap<0,05 vs. grupo controle; ^bp<0,05 vs. grupo H_2O_2 (500 μM).

Fonte: Elaborado pelo autor.

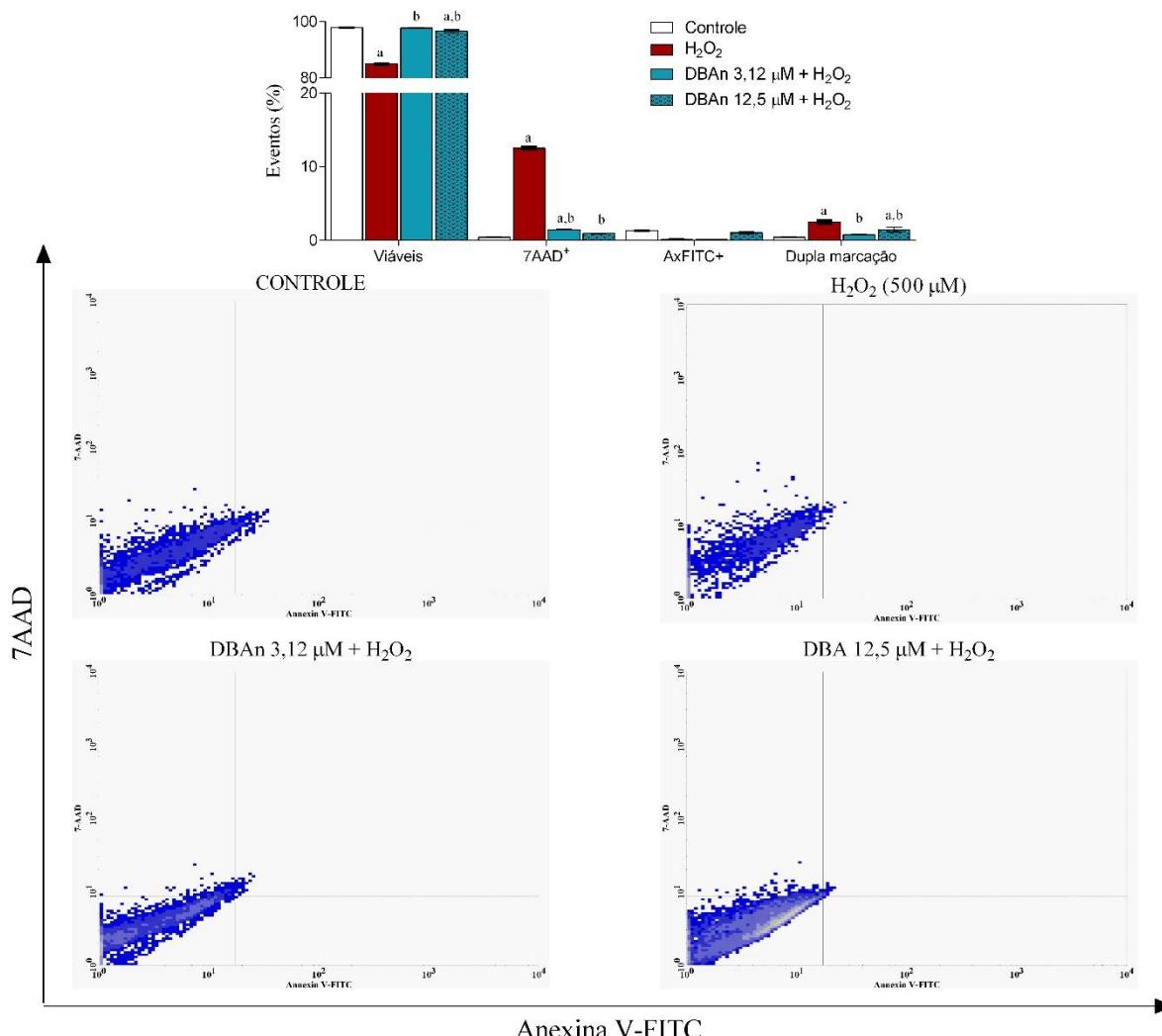
Figura 17. Eventos de morte celular em macrófagos tratados com DBA submetidos à lesão por peróxido de hidrogênio (H_2O_2).



Legenda: As células foram classificadas como viáveis (não marcadas, quadrante inferior esquerdo), 7AAD⁺ (dano de membrana, quadrante superior esquerdo), AxFITC⁺ (externalização de fosfatidilserina, quadrante inferior direito) e células duplamente marcadas (quadrante superior direito). Os dados estão expressos como média ± erro padrão médio, e os dados foram analisados com *two-way* ANOVA com pós-teste de Tukey. ^ap<0,05 vs. grupo controle; ^bp<0,05 vs. grupo H_2O_2 (500 μM).

Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 18. Eventos de morte celular em macrófagos tratados com DBAn submetidos à lesão por peróxido de hidrogênio (H_2O_2).



Legenda: As células foram classificadas como viáveis (não marcadas, quadrante inferior esquerdo), 7AAD⁺ (dano de membrana, quadrante superior esquerdo), AxFITC⁺ (externalização de fosfatidilserina, quadrante inferior direito) e células duplamente marcadas (quadrante superior direito). Os dados estão expressos como média ± erro padrão médio, e os dados foram analisados com *two-way ANOVA* com pós-teste de Tukey. ^ap<0,05 vs. grupo controle; ^bp<0,05 vs. grupo H_2O_2 (500 μM).

Fonte: Elaborado pelo autor.

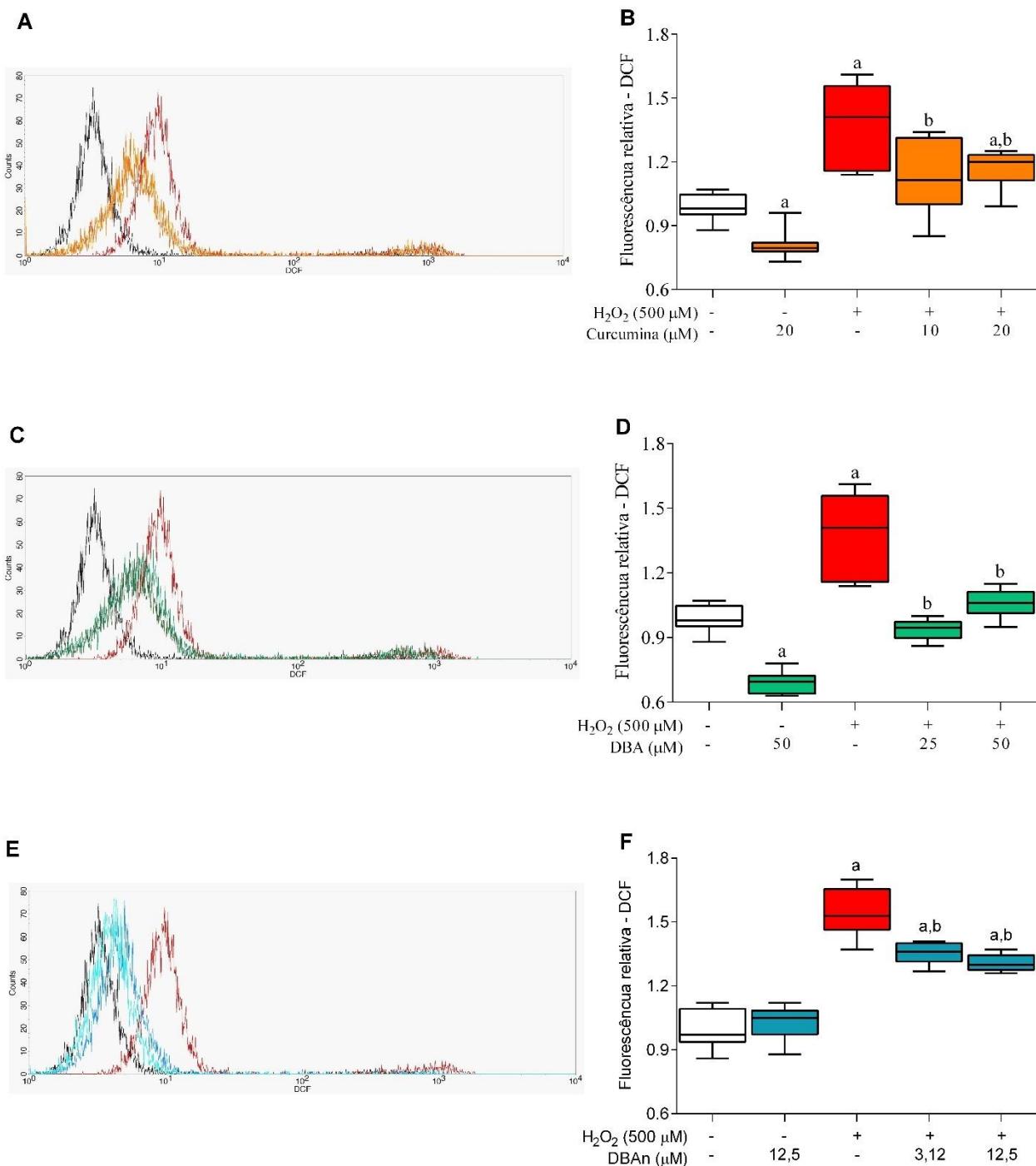
4.5 Acúmulo de ERO citoplasmático

O dano celular induzido pelo peróxido de hidrogênio se dá principalmente pelo aumento excessivo de acúmulo de ERO intracellular e consequente saturação dos mecanismos de resposta antioxidante. Para avaliar esse fenômeno, a mensuração do

acúmulo citoplasmático de ERO foi realizada através da identificação da fluorescência relativa à oxidação do DCF-DA.

Como ilustrado na Figura 19, foi observado um aumento de 40 a 50% no acúmulo de ERO causado pelo H₂O₂. A curcumina foi capaz de reduzir parcialmente esse acúmulo em aproximadamente 60% na concentração 20 µM e completamente na concentração 10 µM enquanto a DBAns reduziu em aproximadamente 20% em todas as concentrações testadas e a DBAc, em todas as concentrações testadas, preveniu completamente o acúmulo de ERO nos macrófagos. Ademais, observou-se uma redução basal e ERO na ausência do estímulo oxidativo (H₂O₂), indicando um potencial de prevenção a condições subclínicas de estresse oxidativo.

Figura 19. Efeito dos curcumínóides sobre o acúmulo citoplasmático de ERO



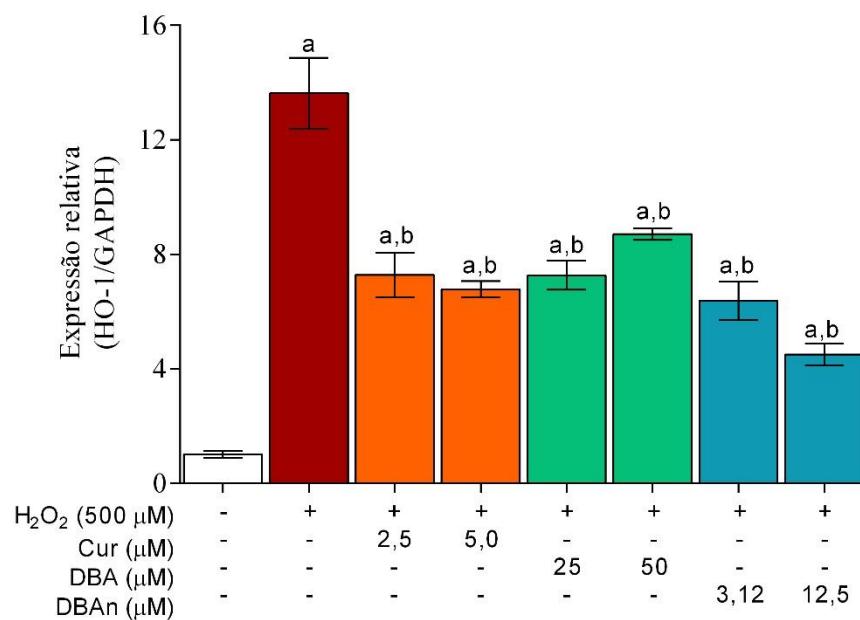
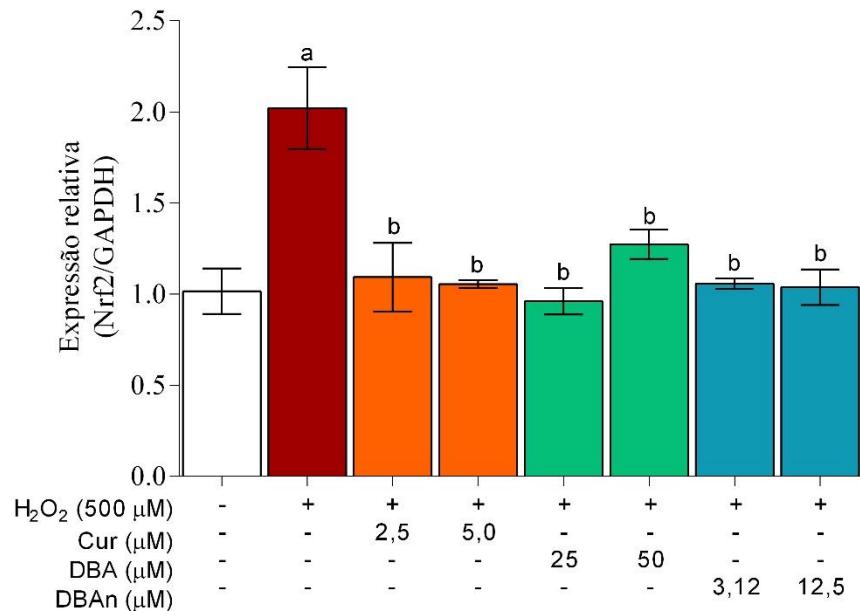
Legenda: Os dados estão expressos como média \pm erro padrão médio, e os dados foram analisados com two-way ANOVA com pós-teste de Tukey. ^ap<0,05 vs. grupo controle; ^bp<0,05 vs. grupo H_2O_2 ($500 \mu\text{M}$).

Fonte: Elaborado pelo autor

4.6 Ensaios de Biologia Molecular

Para avaliar o efeito dos curcuminoides sintéticos DBA e DBAn sobre a expressão gênica de Nrf2 e HO-1, foi realizada a técnica de RT-qPCR. Foi possível observar que o estresse oxidativo aumentou a expressão, tanto de Nrf2, quanto de HO-1 e a curcumina e os curcuminoides foram capazes de reduzir essa expressão.

O estresse oxidativo dobrou a expressão do fator de transcrição nuclear Nrf2, enquanto que, para HO-1, houve um aumento de 13 vezes em sua expressão. DBA e DBAn, assim como a curcumina, foram capazes de diminuir a expressão de ambos os genes como mostra a figura 20.

Figura 20. Expressão relativa de mRNA

Legenda: Dados expressos como media \pm erro padrão médio, analisados por one-way ANOVA com pós teste de Tukey. ^ap<0,05 vs. grupo controle; ^bp<0,05 vs. grupo H_2O_2 (500 μM).

Fonte: Elaborado pelo autor

DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

Os resultados apresentados demonstraram a atividade antioxidante e citoprotetora de dois curcuminoides sintéticos monocarbonilados, cuja atividades foram mantidas apesar das alterações estruturais em relação à curcumina. Esse efeito parece ser superior ao da molécula natural, uma vez que acontece em maior intensidade e/ou com menor toxicidade. Além disso, as interações mostradas nas simulações de *docking* molecular sugerem que DBA e DBAn apresentam capacidade de ancoramento à Keap1 de forma semelhante ao observado para curcumina. Esses resultados são inovadores e podem contribuir para o desenvolvimento de estratégias farmacológicas antioxidantes úteis em diferentes contextos clínicos.

No presente trabalho, foi investigada a participação da via de sinalização *Keap1/Nrf2/ARE* no efeito antioxidante e citoprotetor das moléculas. Essa é uma das vias mais importantes para manutenção do equilíbrio redox intracelular e a resposta tecidual ao estresse oxidativo e tem sido considerada o principal mecanismo de ação da curcumina. Dessa forma, essa via representa um importante alvo farmacológico para a terapia antioxidante. A simulação *in silico* demonstrou que curcumina, DBA e DBAn foram capazes de interagir com Keap1, principalmente com seu domínio de ligação a Nrf2. Essa interação pode contribuir para a redução da ubiquitinação e degradação proteolítica de Nrf2 e, consequentemente, para a ativação dessa via de sinalização molecular (Ooi; Mohammad; Sharif, 2014; Radi, 2022).

O domínio Kelch de Keap1 é, sem dúvidas, o mais relevante enquanto alvo farmacológico, pois é nele em que se encontra o sítio de ligação ao peptídeo Nrf2, através de uma rede de ligações de hidrogênio. Os resíduos mais importantes que participam dessa rede são Arginina (380, 415 e 483), Tirosina (334), Serina (508, 555 e 602), Glutamina (530) e Asparagina (382) (BARROS; OLIVEIRA; SILVA, 2022). Dessa forma, substâncias capazes de interagir diretamente com um ou mais desses resíduos podem contribuir para impedir ou retardar a ligação de Keap1 a Nrf2.

Curcumina, DBA e DBAn se ancoraram ao sítio ativo de Keap1, interagindo com resíduos importantes para a ligação com Nrf2. Outras moléculas bioativas tem demonstrado interação com esses resíduos, como ácido elágico, um metabólito secundário fenólico vegetal conhecidamente antioxidante (Elias De Lima Barros; Oliveira; Barreto Da Silva,

[s.d.]). Esses dados fortalecem a importância dessa região para a estabilização do complexo Keap1-Nrf2 e a potencialidade terapêutica de moléculas capazes de interferir nesse complexo. Em especial, os resíduos Arg483 e Ser508 são responsáveis pelo reconhecimento de Nrf2 (Baird; Yamamoto, 2020; Hassanein et al., 2020). Portanto, sugere-se que as substâncias interfiram na ligação de Keap1 a Nrf2, ativando a via e, consequentemente, aumentando a expressão de enzimas antioxidantes (Baird; Yamamoto, 2020).

Em contraste, alguns trabalhos mostram ainda outras possíveis interações de curcumina com resíduos de cisteina do domínio *Kelch*, que são responsáveis pelo reconhecimento de ERO no microambiente citoplasmático e consequente mudança conformacional de Keap1, causando a liberação de Nrf2 (Dikovskaya; Dinkova-Kostova, 2020; Tkachev; Menshchikova; Zenkov, 2011). Tais interações não foram observadas no presente estudo. Possivelmente, diferenças na estrutura cristalográfica das proteínas-alvo usada nesses artigos podem explicar essa diferença, representando outro padrão conformacional de Keap1.

O domínio BTB, por sua vez, é responsável pelo reconhecimento de Ubiquitina Ligase E3, que promove a degradação proteolítica do fator de transcrição Nrf2, mediado principalmente pela ligação com Cys151. Contudo, tanto curcumina quanto DBA e DBAn acoplaram em sítio diferente do inibidor cocristalizado nesse domínio, interagindo principalmente com Lys-61, Phe-64, Phe-139, Ala-143 e Ile-164. Apesar de a interação ser promissora, não está descrito, até o momento, o papel desses resíduos na função biológica de Keap1, ou de que forma a interação com eles possa contribuir para o efeito biológico de curcumina e seus derivados (Chen, Yifan et al., 2021; Cheng et al., 2021; Lu, Mengchen et al., 2024).

Ressalta-se também que, apesar de alterar a interação com alguns aminoácidos, a substituição do grupo β -dicetona caraterístico de curcumina por uma monocarbonila não prejudicou o ancoramento das moléculas em Keap1, mantendo-se semelhantes as energias de interação, as distâncias entre elas e a região onde aconteceu a ancoragem. Esse resultado é importante, uma vez que indica que as moléculas sintéticas podem atuar de maneira semelhante à curcumina, possivelmente sem prejuízo à suas bioatividades. Esses dados torna possível um melhor entendimento sobre o mecanismo de ação de curcuminoides naturais e sintéticos, bem como a predição e *design* racional de novas

moléculas.

Após a realização das simulações de *docking* molecular, as substâncias foram submetidas a ensaios *in vitro* para avaliação de seu efeito protetor em modelo de lesão celular induzida por estresse oxidativo. Inicialmente, foi realizado o ensaio de viabilidade celular em macrófagos, para identificação das concentrações adequadas aos demais experimentos. Os macrófagos são células importantes envolvidas na resposta ao estresse oxidativo, uma vez que liberam diversos mediadores importantes para progressão ou modulação da resposta tecidual a agentes agressores (Davies et al., 2013; Varol; Mildner; Jung, 2015). Por isso, o presente trabalho utilizou macrófagos murinos da linhagem RAW264.7, que são amplamente utilizados em pesquisa biológica e farmacológica.

Foi possível observar que a substituição química dos curcumínicos sintéticos gerou uma considerável redução de citotoxicidade, quando comparado aos resultados obtidos para curcumina. Esse achado se deve principalmente à estrutura ceto-enólica da curcumina dependente de pH, que faz com que seu grupo beta-dicetona alterne para um álcool por meio de estruturas de ressonância. Essa característica confere alta reatividade à molécula da curcumina, uma vez que permite a complexação com diversas proteínas. Os análogos sintéticos monocarbonilados DBA e DBAn, por sua vez, não apresentam estrutura ceto-enólica, tendo assim, menor reatividade e toxicidade, além de maior estabilidade em pH fisiológico.

Adicionalmente, a biodisponibilidade por via oral de curcumina também é comprometida por sua interação com enzimas intestinais, que a metabolizam antes mesmo da absorção (Anand et al., 2007; Kotha; Luthria, 2019). Além da interação com proteínas, a curcumina também apresenta alta susceptibilidade à glicuronidação por meio dos hepatócitos, fazendo com que sua velocidade de biotransformação seja elevada, e seu tempo de $\frac{1}{2}$ vida, curto (Anand et al., 2007). Estudos de análogos monocarbonilados da curcumina relatam melhora importante na solubilidade e biodisponibilidade sem perca ou até com aumento de potência de ação biológica. Alguns autores chegaram a relatar 60% de aumento de biodisponibilidade oral apenas pela substituição do Sistema Beta-Dicetona pela monocarbonila (Mosley; Liotta; Snyder, 2007).

A partir dos ensaios de citotoxicidade, foram selecionadas as faixas de concentração de DBA, DBAn e curcumina para o ensaio de lesão celular induzido por estresse oxidativo. Pelo caráter multifatorial e a ampla gama de sistemas biológicos acometidos por esse

processo, é de extrema importância o estudo e desenvolvimento de terapias alvo para o estresse oxidativo (Sies, 2015). A indução de estresse oxidativo em macrófagos por peróxido de hidrogênio se mostra uma das técnicas mais eficientes para essa avaliação, tanto pelo papel fundamental desenvolvido pelos macrófagos na resposta antioxidante, quanto pela rápida e eficiente ação oxidante do peróxido de hidrogênio (Fonseca et al., 2014; Han, Shuo et al., 2024). Além disso, trata-se de uma técnica facilmente reproduzível.

A avaliação laboratorial do estresse oxidativo pode se dar através de diferentes métodos. Em estudos *in vivo*, esses estudos são realizados em pacientes com condições clínicas que envolvem estresse oxidativo, como no trabalho de Shahvali et al. (2019) no qual foram associados os níveis de estresse oxidativo plasmático em pacientes diabéticos ao aparecimento de desfechos clínicos como nefropatia e hipertensão. Além disso, pode ser realizada a indução de estresse oxidativo em animais de laboratório, como estudado por Zha et al. (2022), no qual é avaliado o uso de produtos naturais antioxidantes em um modelo animal de esclerose múltipla (Bottino et al., 2015; Li, Yupei et al., 2023; Reckelhoff; Romero; Yanes Cardozo, 2019b).

Já em modelos *in vitro*, além de mimetizar doenças que envolvam o estresse oxidativo relacionado a diferentes sistemas biológicos, também é possível induzir a formação de um microambiente oxidativo inespecífico em uma linhagem celular, sem necessariamente mimetizar uma doença (Alves et al., 2023; Carini et al., 2017; Chowdhury; Saikia, 2022; Feitosa et al., 2018; Zhou et al., 2022). Assim, permite-se tanto a triagem do potencial antioxidante de substâncias bioativas quanto sua aplicabilidade para o tratamento de condições específicas.

A lesão causada pelo peróxido de hidrogênio se deve ao desequilíbrio nas reações intracelulares de conversão e eliminação das espécies reativas de oxigênio, com seu consequente acúmulo citoplasmático. As ERO acumuladas causam o dano tecidual observado, incluindo dano direto ao DNA (Chen, Yi et al., 2021; Ooi; Mohammad; Sharif, 2014; Radi, 2022). Muitas vias de sinalização celular participam e são afetadas e respondem a esse processo; dentre elas, destaca-se a via Keap1/Nrf2/ARE (Yeh et al., 2015).

Esse dano direciona para perfis de morte celular diferentes a depender da concentração e tempo de exposição. Trabalhos que utilizaram peróxido de hidrogênio em concentrações altas com curtos períodos de exposição encontram aspectos celulares

associados a necrose. Oliveira, M. et al. (2015), observou que a exposição de *Aspergillus fuminatus* a altas concentrações de peróxido de hidrogênio por 1h, aumentou a expressão de metacaspases relacionadas a necrose. Já Takeda et al. (1999) observou o mesmo efeito em células de tubulares renais de rato associado à degradação da molécula de DNA.

De modo diferente, trabalhos com tempos de exposição a partir de 8 horas de peróxido de hidrogênio, encontraram um perfil de morte celular voltado para a apoptose ou apoptose tardia, como Qi et al. (2022), que observou uma dupla marcação com 7AAD/Ax, o que denota, tanto externalização de membrana quanto exposição do DNA, característica de um perfil misto de morte celular chamado de apoptose tardia.

Esses resultados corroboram para os resultados encontrados no presente trabalho, no qual o peróxido de hidrogênio aumentou a marcação por 7AAD, denotando exposição da molécula de DNA, característica marcante de processos necróticos.

Como observado nos resultados, tanto curcumina quanto os curcuminoídes DBAn e DBA foram capazes de proteger os macrófagos da lesão causada por peróxido de hidrogênio, mostrando que a ação antioxidante se mantém após a substituição da β-dicetona por monocarbonila. Possivelmente, esse efeito citoprotetor está diretamente ligado ao efeito antioxidante dessas moléculas, que podem atuar reduzindo a concentração de ERO no microambiente celular e a consequente morte celular. De fato, o efeito citoprotetor de moléculas antioxidantes tem sido amplamente descrito na literatura, como melatonina (Cardinali; Pandi-Perumal; Brown, 2024), genisteína (Grossini et al., 2017), trimetazidina (Castedo et al., 2005) e piceatanol (Da Costa et al., 2019). Esses dados corroboram com nossos achados, em especial indicando que moléculas capazes de modular a resposta bioquímica e tecidual a agentes oxidantes são promissoras no contexto do desenvolvimento de novos fármacos.

Para avaliar o potencial antioxidante propriamente dito das moléculas em macrófagos, inicialmente foram realizados ensaios de citometria de fluxo. Os resultados indicaram que DBA eDBAN, assim como curcumina, apresentaram ação protetora sobre o acúmulo citoplasmático de ERO induzido por H₂O₂. O efeito antioxidante de curcumina está bem descrito na literatura. Qi et al. (2022), demonstrou o potencial da curcumina em diminuir o estresse oxidativo e a resposta inflamatória em condrócitos lesados por peróxido de hidrogênio. Já Yang, Jiang e Shi (2017), observaram a capacidade da curcumina em aumentar a expressão de Hemeoxigenase-1, aumentando a prevenção contra o estresse

oxidativo gerado por peróxido de hidrogênio em cardiomioblastos.

O potencial antioxidante dos análogos se manteve similar à curcumina, destacando-se a DBAn por apresentar ação em uma faixa de concentrações semelhante. Alguns autores apontam que as ações biológicas da curcumina se devem, principalmente, aos seus componentes aromáticos fenólicos. Assim, sugere-se que substituições nos anéis aromáticos sejam as principais responsáveis por diferenças na magnitude e espectro de efeitos farmacológicos (Chainglou e Litina, 2020). Esses dados podem ajudar a explicar a diferença de efeito observada para DBA e DBAn. Adicionalmente, alguns trabalhos citam que o prolongamento da cadeia alifática não irá necessariamente alterar suas propriedades farmacológicas, desde que não haja prejuízo para a interação com receptores (Alam, Sarfaraz et al., 2024; Baptistella et al., 2024; Zang et al., 2024).

Diversos autores apontam a dupla ação antioxidante da curcumina, tanto aumentando diretamente a atividade de enzimas antioxidantes como catalase, Superóxido Dismutase e Glutatona Peroxidase, quanto aumentando a sinalização de Nrf2 (Cai et al., 2022; Sahoo et al., 2023). Trabalhos de *Docking* molecular demonstraram encaixe direto da curcumina nas enzimas Catalase e Superóxido Dismutase e associaram com o aumento da atividade enzimática e em testes *in vitro*, na ausência de outras ferramentas antioxidantes do maquinário celular como a via de sinalização Keap1/Nrf2/ARE (Liu et al., 2024; Mishra et al., 2022; Samal et al., 2023; Simin khataee et al., 2019). Quanto à ação direta de curcumina frente à Glutatona peroxidase, apesar de vários artigos relatarem que há esse efeito, não há estudos confiáveis demonstrando o mecanismo pelo qual ocorre essa interação *in silico* ou *in vitro*. Portanto, destaca-se principalmente a sua ação pela via Keap1/Nrf2 (Ming et al., 2024).

Nesse contexto, acredita-se que efeito similar seja causado por DBA e DBAn os derivados sintéticos estudados também apresentam perfil de duplo mecanismo antioxidante pelo potencial observado nos resultados. Uma diferença observada entre a substância natural e os análogos é que a curcumina, em altas concentrações, promove o efeito contrário, aumentando o estresse oxidativo (Gupta; Patchva; Aggarwal, 2013; Hsiao et al., 2021; Lin et al., 2019b). Os resultados obtidos para DBA e DBAn não demonstraram esse tipo de efeito controverso.

Assim, os curcuminoides sintéticos apresentaram efeito antioxidante similar ao da curcumina, caracterizado por pela redução do acúmulo citoplasmático de ERO.

Os cucuminoides, assim como a curcumina, apresentaram atividade reguladora de Nrf2 uma vez que reduziram sua expressão, bem como da HO-1. A lesão por estresse oxidativo induzida por peróxido de hidrogênio em curtos períodos leva a um aumento da expressão de mRNA para Nrf2, enquanto o prolongamento da exposição acaba por diminuir essa expressão (Lin et al., 2019a). Nesse mesmo estudo, Lin observou que, com 8 horas de exposição ao peróxido de hidrogênio inverte o perfil de expressão gênica.

Outros autores também apontam para o potencial regulatório da curcumina sobre a via Nrf2. Foi observado por Méndez-García et al. (2019) que a exposição a baixas concentrações de curcumina por tempos de até 12 h causa uma superexpressão de Nrf2 e das proteínas do ARE, enquanto que períodos de exposição maiores (18 – 24h), regulam essa expressão evitando a superativação da Via Keap1/Nrf2/ARE.

DBA e DBAn, em concordância com Curcumina, ao reduzir o nível da lesão celular aguda, geraram um processo de *downregulation* na via Keap1/Nrf2/ARE, uma vez que regulam ao longo das 24h de exposição, resultaram no equilíbrio das concentrações de Nrf2 e ARE, reduzindo a intensidade do estresse oxidativo causado pelo peróxido de hidrogênio e a necessidade de superexpressão de Nrf2 e HO-1, diminuindo a morte celular associada a essa superativação (Méndez-García et al., 2019).

Em contrapartida, trabalhos com tempo maior de indução e menor tempo de tratamento, mostraram um efeito contrário no qual a lesão reduz a expressão de mRNA para Nrf2 e HO-1 uma vez que depletam o maquinário celular de regulação redox e, nesse cenário, a ativação da via de sinalização do Nrf2 pela curcumina auxilia no aumento da expressão de mRNA para esses componentes (Chen, Hong Guang et al., 2013; Han, Shan et al., 2019; Li, Wan; Sun, 2020).

Em consonância com os resultados observados no *docking molecular*, destaca-se a interação da curcumina e dos curcuminoides sintéticos monocarbonilados na Keap1, desacoplando o Nrf2 e aumentando sua translocação e consequentemente a ativação de ARE (Qi et al., 2022).

O presente estudo apresentou algumas limitações, em especial por se tratar de um modelo *in vitro* inespecífico de estresse oxidativo. Assim, ensaios posteriores voltados ao estabelecimento e progressão de estresse oxidativo em condições clínicas específicas precisam ser realizados futuramente para comprovar a eficácia das moléculas para o tratamento dessas doenças. Apesar disso, os resultados aqui apresentados demonstram

pela primeira vez a potencialidade terapêutica desses derivados sintéticos monocarbonilados no controle do estresse oxidativo e consequente prevenção do dano tecidual associado.

O presente trabalho abre perspectivas para o melhor entendimento das vias de sinalização envolvidas na resposta tecidual ao estresse oxidativo, bem como para a identificação e validação de alvos promissores para o desenvolvimento de novos fármacos. Os dados apresentados podem ainda contribuir ainda para o entendimento das relações estrutura-atividade de curcuminoïdes de interesse para a pesquisa científica. Ademais, os achados aqui apresentados sugerem a potencialidade de uso das moléculas em estudo em modelos experimentais específicos de doenças associadas ao estresse oxidativo, em que a ativação da via Keap1/Nrf2/ARE pode ser explorada como alvo farmacológico promissor.

CONCLUSÃO

6 CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos, conclui-se que os curcuminoides sintéticos monocarbonilados DBA e DBAn apresentam citoprotetor em macrófagos de maneira superior ao observado para curcumina. Além disso, o tratamento com DBA e DBAn foi capaz de proteger essas células do acúmulo de ERO citoplasmáticas. Esse efeito parece estar associado à interação dessas substâncias com o domínio Kelch de Keap-1, estimulando a ativação da via Keap1/NRF2/ARE e equilibrando-a, diminuindo o estresse oxidativo causado pelo peróxido de hidrogênio. Esses resultados podem contribuir para o entendimento dos mecanismos protetores dos curcuminoides, bem como para direcionar o uso dessas moléculas em modelos experimentais futuros.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

- DBA e DBAn interagem com aminoácidos na Keap1 responsáveis pelo acoplamento de Nrf2, semelhante à Curcumina;
- DBA e DBAn apresentam menor citotoxicidade em macrófagos em relação à Curcumina;
- DBA e DBAn possuem atividade citoprotetora e antioxidante superior à da Curcumina;
- DBA e DBAn reduzem a produção e o acúmulo de ERO citoplasmática;
- DBA e DBAn reduzem a expressão gênica de Nrf2 e HO-1.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- ABD EL-HACK, Mohamed E. et al. Curcumin, the active substance of turmeric: its effects on health and ways to improve its bioavailability. **Journal of the science of food and agriculture**, v. 101, n. 14, p. 5747–5762, 1 nov. 2021. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34143894/>>. Acesso em: 12 jan. 2025.
- ADAMS, James D. Possible causes of Parkinson's disease. **Frontiers in bioscience (Landmark edition)**, v. 26, n. 8, p. 387–394, 30 ago. 2021. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34455768/>>. Acesso em: 14 jan. 2025.
- ADAN, Aysun et al. Flow cytometry: basic principles and applications. **Critical reviews in biotechnology**, v. 37, n. 2, p. 163–176, 17 fev. 2017. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26767547/>>. Acesso em: 12 jan. 2025.
- ADASME, Melissa F. et al. PLIP 2021: expanding the scope of the protein-ligand interaction profiler to DNA and RNA. **Nucleic acids research**, v. 49, n. W1, p. W530–W534, 2 jul. 2021. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33950214/>>. Acesso em: 12 jan. 2025.
- AHMAD, Iftikhar et al. Curcumin, its derivatives, and their nanoformulations: Revolutionizing cancer treatment. **Cell biochemistry and function**, v. 42, n. 1, 1 jan. 2024. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38269517/>>. Acesso em: 12 jan. 2025.
- AHMAD, Khalil Ali et al. Antioxidant therapy for management of oxidative stress induced hypertension. **Free radical research**, v. 51, n. 4, p. 428–438, 3 abr. 2017. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28427291/>>. Acesso em: 12 jan. 2025.
- ALAM, Mohammad Shah; CZAJKOWSKY, Daniel M. SARS-CoV-2 infection and oxidative stress: Pathophysiological insight into thrombosis and therapeutic opportunities. **Cytokine & growth factor reviews**, v. 63, p. 44–57, 1 fev. 2022. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34836751/>>. Acesso em: 10 fev. 2025.
- ALAM, Sarfaraz et al. Pharmacophore & QSAR Guided Design, Synthesis, Pharmacokinetics and In vitro Evaluation of Curcumin Analogs for Anticancer Activity. **Current medicinal chemistry**, v. 31, n. 5, p. 620–639, 3 maio 2024. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37132141/>>. Acesso em: 13 jan. 2025.
- ALVES, Luana de Fátima et al. Improving *Saccharomyces cerevisiae* acid and oxidative stress resistance using a prokaryotic gene identified by functional metagenomics. **Heliyon**, v. 9, n. 4, 1 abr. 2023. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37077683/>>. Acesso em: 12 jan. 2025.
- ANAND, Preetha et al. Bioavailability of curcumin: problems and promises. **Molecular pharmaceutics**, v. 4, n. 6, p. 807–818, nov. 2007. Disponível em:

<<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17999464/>>. Acesso em: 11 jan. 2025.

AOYAMA, Koji; WATABE, Masahiko; NAKAKI, Toshio. Regulation of neuronal glutathione synthesis. **Journal of Pharmacological Sciences**, v. 108, n. 3, p. 227–238, 2008. Acesso em: 19 nov. 2024.

ARSHAD, Laiba et al. An overview of structure-activity relationship studies of curcumin analogs as antioxidant and anti-inflammatory agents. **Future medicinal chemistry**, v. 9, n. 6, p. 605–626, 1 abr. 2017. Disponível em:

<<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28394628/>>. Acesso em: 12 jan. 2025.

ASANTEWAA, Gloria; HARRIS, Isaac S. Glutathione and its precursors in cancer. **Current opinion in biotechnology**, v. 68, p. 292–299, 1 abr. 2021. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33819793/>>. Acesso em: 19 nov. 2024.

AVERILL-BATES, Diana A. The antioxidant glutathione. **Vitamins and hormones**, v. 121, p. 109–141, 1 jan. 2023. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36707132/>>. Acesso em: 19 nov. 2024.

BAIRD, Liam; YAMAMOTO, Masayuki. The Molecular Mechanisms Regulating the KEAP1-NRF2 Pathway. **Molecular and cellular biology**, v. 40, n. 13, 15 jun. 2020. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32284348/>>. Acesso em: 12 jan. 2025.

BALLATORI, Nazzareno et al. Glutathione dysregulation and the etiology and progression of human diseases. **Biological chemistry**, v. 390, n. 3, p. 191–214, 1 mar. 2009. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19166318/>>. Acesso em: 12 jan. 2025.

BAPTISTELLA, Mariane Minussi et al. A synthetic resveratrol-curcumin hybrid derivative exhibits chemopreventive effects on colon pre-neoplastic lesions by targeting Wnt/β-catenin signaling, anti-inflammatory and antioxidant pathways. **The Journal of pharmacy and pharmacology**, v. 76, n. 5, p. 479–488, 1 maio 2024. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37874746/>>. Acesso em: 13 jan. 2025.

BATISTA DE ANDRADE NETO, João et al. Anti-MRSA activity of curcumin in planktonic cells and biofilms and determination of possible action mechanisms. **Microbial pathogenesis**, v. 155, 1 jun. 2021. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33894289/>>. Acesso em: 12 jan. 2025.

BEAVERS, William N.; SKAAR, Eric P. Neutrophil-generated oxidative stress and protein damage in *Staphylococcus aureus*. **Pathogens and disease**, v. 74, n. 6, 1 ago. 2016. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27354296/>>. Acesso em: 12 jan. 2025.

BEKYAROVA, Ganka Y. et al. Association between Nfr2, HO-1, NF-κB Expression, Plasma ADMA, and Oxidative Stress in Metabolic Syndrome. **International journal of molecular sciences**, v. 24, n. 23, 1 dez. 2023. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38069389/>>. Acesso em: 12 jan. 2025.

BERMAN, Helen; HENRICK, Kim; NAKAMURA, Haruki. Announcing the worldwide Protein Data Bank. **Nature Structural & Molecular Biology** 2003 10:12, v. 10, n. 12, p. 980–980, dez. 2003. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/nsb1203-980>>. Acesso em: 12 jan. 2025.

BHANDARI, Shashikant Vasantrao et al. A Review: Exploring Synthetic Schemes and Structure-activity Relationship (SAR) Studies of Mono-carbonyl Curcumin Analogues for Cytotoxicity Inhibitory Anticancer Activity. **Current organic synthesis**, v. 20, n. 8, p. 821–837, 27 jan. 2023. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36703591/>>. Acesso em: 12 jan. 2025.

BHATIA, Nidhi K. et al. Curcumin binds to the pre-fibrillar aggregates of Cu/Zn superoxide dismutase (SOD1) and alters its amyloidogenic pathway resulting in reduced cytotoxicity. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics**, v. 1854, n. 5, p. 426–436, 1 maio 2015. Acesso em: 11 jan. 2025.

BJØRKlund, Geir et al. Selenium: An Antioxidant with a Critical Role in Anti-Aging. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 27, n. 19, 1 out. 2022. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36235150/>>. Acesso em: 12 jan. 2025.

BOTTINO, Daniel Alexandre et al. Relationship between biomarkers of inflammation, oxidative stress and endothelial/microcirculatory function in successful aging versus healthy youth: a transversal study. **BMC geriatrics**, v. 15, n. 1, 8 abr. 2015. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25888078/>>. Acesso em: 12 jan. 2025.

BURGOS, Rosilene Cristina Rossetto et al. Cellular glutathione levels in HL-60 cells during respiratory burst are not correlated with ultra-weak photon emission. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 175, p. 291–296, 1 out. 2017. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/319593960_Cellular_glutathione_levels_in_HL-60_cells_during_respiratory_burst_are_not_correlated_with_ultra-weak_photon_emission>. Acesso em: 11 fev. 2025.

CAI, Yi et al. Role of curcumin in the treatment of acute kidney injury: research challenges and opportunities. **Phytomedicine : international journal of phytotherapy and phytopharmacology**, v. 104, 1 set. 2022. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35809376/>>. Acesso em: 13 jan. 2025.

CARDINALI, Daniel P.; PANDI-PERUMAL, Seithikurippu R.; BROWN, Gregory M. Melatonin as a Chronobiotic and Cytoprotector in Non-communicable Diseases: More than an Antioxidant. **Sub-cellular biochemistry**, v. 107, p. 217–244, 2024. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/39693027/>>. Acesso em: 10 fev. 2025.

CARINI, Francesco et al. Colorectal Carcinogenesis: Role of Oxidative Stress and Antioxidants. **Anticancer research**, v. 37, n. 9, p. 4759–4766, 1 set. 2017. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28870894/>>. Acesso em: 12 jan. 2025.

CASTEDO, Evaristo et al. Daño por isquemia-reperfusión durante el trasplante cardíaco experimental. Evaluación del papel citoprotector de la trimetazidina. **Revista Española de Cardiología (English Edition)**, v. 58, n. 8, p. 941–950, 1 ago. 2005. Disponível em: <<https://www.revespcardiol.org/es-dano-por-isquemia-reperfusion-durante-el-articulo-13078131>>. Acesso em: 10 fev. 2025.

CERVANTES, Jocelyn et al. Elevated apolipoprotein C3 augments diabetic kidney disease and associated atherosclerosis in type 2 diabetes. **JCI insight**, v. 9, n. 12, 24 jun. 2024. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38743496/>>. Acesso em: 12 jan. 2025.

CHAINOGLOU, Eirini; HADJIPAVLOU-LITINA, Dimitra. Curcumin in Health and Diseases: Alzheimer's Disease and Curcumin Analogues, Derivatives, and Hybrids. **International journal of molecular sciences**, v. 21, n. 6, 1 mar. 2020. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32183162/>>. Acesso em: 11 jan. 2025.

CHAUDHARY, Mani Raj et al. Aging, oxidative stress and degenerative diseases: mechanisms, complications and emerging therapeutic strategies. **Biogerontology**, v. 24, n. 5, p. 609–662, 1 out. 2023. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37516673/>>. Acesso em: 12 jan. 2025.

CHEN, Hong Guang et al. Heme oxygenase-1 mediates the anti-inflammatory effect of molecular hydrogen in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages. **International Journal of Surgery**, v. 11, n. 10, p. 1060–1066, 1 dez. 2013. Acesso em: 9 mar. 2025.

CHEN, Yi et al. Liraglutide reduces coronary endothelial cells no-reflow damage through activating MAPK/ERK signaling pathway. **Journal of receptor and signal transduction research**, v. 41, n. 6, p. 553–557, 2021. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33045879/>>. Acesso em: 12 jan. 2025.

CHEN, Yifan et al. Phosphorylation regulates cullin-based ubiquitination in tumorigenesis. **Acta pharmaceutica Sinica. B**, v. 11, n. 2, p. 309–321, 1 fev. 2021. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33643814/>>. Acesso em: 13 jan. 2025.

CHENG, Yuanyuan et al. Covalent modification of Keap1 at Cys77 and Cys434 by pubescenoside a suppresses oxidative stress-induced NLRP3 inflammasome activation in myocardial ischemia-reperfusion injury. **Theranostics**, v. 11, n. 2, p. 861–877, 2021. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33391509/>>. Acesso em: 13 jan. 2025.

CHIEW, Angela L.; BUCKLEY, Nicholas A. Acetaminophen Poisoning. **Critical care clinics**, v. 37, n. 3, p. 543–561, 1 jul. 2021. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34053705/>>. Acesso em: 12 jan. 2025.

CHISTIAKOV, Dmitry A. et al. Mechanisms of foam cell formation in atherosclerosis. **Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)**, v. 95, n. 11, p. 1153–1165, 1 nov. 2017. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28785870/>>. Acesso em: 12 jan. 2025.

CHOWDHURY, Sabarna; SAIKIA, Surjya Kumar. Use of Zebrafish as a Model Organism to Study Oxidative Stress: A Review. **Zebrafish**, v. 19, n. 5, p. 165–176, 1 out. 2022. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36049069/>>. Acesso em: 12 jan. 2025.

COOMBES, Jeff S.; FASSETT, Robert G. Antioxidant therapy in hemodialysis patients: a systematic review. **Kidney international**, v. 81, n. 3, p. 233–246, 1 fev. 2012. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21975860/>>. Acesso em: 12 jan. 2025.

DA COSTA, Flávia Póvoa et al. Piceatannol Increases Antioxidant Defense and Reduces Cell Death in Human Periodontal Ligament Fibroblast under Oxidative Stress. **Antioxidants (Basel, Switzerland)**, v. 9, n. 1, 1 jan. 2019. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31878036/>>. Acesso em: 10 fev. 2025.

DAVIES, Luke C. et al. Tissue-resident macrophages. **Nature immunology**, v. 14, n. 10, p. 986–995, 2013. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24048120/>>. Acesso em: 10 fev. 2025.

DHANISHA, Suresh S. et al. Molecular Docking Studies of Naringenin and its Protective Efficacy against Methotrexate Induced Oxidative Tissue Injury. **Anti-cancer agents in medicinal chemistry**, v. 22, n. 1, p. 169–180, 23 mar. 2022. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34225639/>>. Acesso em: 12 jan. 2025.

DIKOVSKAYA, Dina; DINKOVA-KOSTOVA, Albena T. Measuring Changes in Keap1-Nrf2 Protein Complex Conformation in Individual Cells by FLIM-FRET. **Current protocols in toxicology**, v. 85, n. 1, 1 set. 2020. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32786061/>>. Acesso em: 10 fev. 2025.

DONG, Rui et al. Exploration of the mechanism of luteolin against ischemic stroke based on network pharmacology, molecular docking and experimental verification. **Bioengineered**, v. 12, n. 2, p. 12274–12293, 2021. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34898370/>>. Acesso em: 12 jan. 2025.

ELIAS DE LIMA BARROS, Gabriel; OLIVEIRA, Carolina Silva; BARRETO DA SILVA, Vinicius. Potencial inibitório do ácido elágico sobre a formação do complexo keap1-Nrf2: implicações terapêuticas em doenças crônico-degenerativas Inhibitory potential of ellagic acid on the formation of the keap1-Nrf2 complex: Therapeutical implications in chronic-degenerative diseases. [s.d.]. Acesso em: 14 jan. 2025a.

Potencial inibitório do ácido elágico sobre a formação do complexo keap1-Nrf2: implicações terapêuticas em doenças crônico-degenerativas Inhibitory potential of ellagic acid on the formation of the keap1-Nrf2 complex: Therapeutical implications in chronic-degenerative diseases. . [S.l: s.n.], [s.d.].

ERUSLANOV, Evgeniy; KUSMARTSEV, Sergei. Identification of ROS using oxidized DCFDA and flow-cytometry. **Methods in Molecular Biology**, v. 594, p. 57–72, 2010. Acesso em: 12 jan. 2025.

FAN, Jianglin; WATANABE, Teruo. Atherosclerosis: Known and unknown. **Pathology international**, v. 72, n. 3, p. 151–160, 1 mar. 2022. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35076127/>>. Acesso em: 12 jan. 2025.

FARHAT, Faiza et al. Curcumin in Wound Healing-A Bibliometric Analysis. **Life (Basel, Switzerland)**, v. 13, n. 1, 1 jan. 2023. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36676091/>>. Acesso em: 19 nov. 2024.

FEITOSA, Chistiane Mendes et al. Determination of Parameters of Oxidative Stress in vitro Models of Neurodegenerative Diseases-A Review. **Current clinical pharmacology**, v. 13, n. 2, p. 100–109, 1 mar. 2018. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29493463/>>. Acesso em: 12 jan. 2025.

FONSECA, Lucas José Sá Da et al. Oxidative status imbalance in patients with metabolic syndrome: role of the myeloperoxidase/hydrogen peroxide axis. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2014, 2014. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25386227/>>. Acesso em: 14 jan. 2025.

FORMAN, Henry Jay; ZHANG, Hongqiao. Author Correction: Targeting oxidative stress in disease: promise and limitations of antioxidant therapy (Nature Reviews Drug Discovery, (2021), 10.1038/s41573-021-00233-1). **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 20, n. 8, p. 652, 1 ago. 2021a. Acesso em: 19 nov. 2024.

_____. Targeting oxidative stress in disease: promise and limitations of antioxidant therapy. **Nature reviews. Drug discovery**, v. 20, n. 9, p. 689–709, 1 set. 2021b. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34194012/>>. Acesso em: 19 nov. 2024.

GROSSINI, Elena et al. Modulation of Oxidative Stress by 17 β-Estradiol and Genistein in Human Hepatic Cell Lines In Vitro. **Cell Physiol Biochem**, v. 42, p. 1051–1062, 2017. Disponível em: <www.karger.com/cpb/www.karger.com/cpb>. Acesso em: 10 fev. 2025.

GUPTA, Subash C.; PATCHVA, Sridevi; AGGARWAL, Bharat B. Therapeutic roles of curcumin: lessons learned from clinical trials. **The AAPS journal**, v. 15, n. 1, p. 195–218, jan. 2013. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23143785/>>. Acesso em: 10 fev. 2025.

H2DCFDA (DCFH-DA) - Blog. Disponível em: <<https://www.glpbio.com/ar/blog/post/h2dcfda-dcfh-da.html>>. Acesso em: 11 fev. 2025.

HAN, Shan et al. Procyanidin A1 Alleviates Inflammatory Response induced by LPS through NF-κB, MAPK, and Nrf2/HO-1 Pathways in RAW264.7 cells. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 15087, 1 dez. 2019. Disponível em: <<https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC6803657/>>. Acesso em: 9 mar. 2025.

HAN, Shuo et al. Quorum sensing signal autoinducer-2 promotes hydrogen peroxide degradation in water by Gram-positive bacteria. **Journal of hazardous materials**, v. 466, 15 mar. 2024. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38280328/>>. Acesso em:

14 jan. 2025.

HANWELL, Marcus D. et al. Avogadro: An advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform. **Journal of Cheminformatics**, v. 4, n. 8, p. 1–17, 13 ago. 2012. Disponível em: <<https://jcheminf.biomedcentral.com/articles/10.1186/1758-2946-4-17>>. Acesso em: 12 jan. 2025.

HASSAN, Huda A.; AHMED, Hind Sh.; HASSAN, Dheefaf F. Free radicals and oxidative stress: Mechanisms and therapeutic targets: Review article. **Human Antibodies**, p. 1–17, 19 jul. 2024. Acesso em: 19 nov. 2024.

HASSANEIN, Emad H.M. et al. Coumarins as Modulators of the Keap1/Nrf2/ARE Signaling Pathway. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2020, 2020.

HSIAO, An Fang et al. The efficacy of high- and low-dose curcumin in knee osteoarthritis: A systematic review and meta-analysis. **Complementary therapies in medicine**, v. 63, 1 dez. 2021. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34537344/>>. Acesso em: 10 fev. 2025.

HUANG, Jing et al. Selenium Status and Its Antioxidant Role in Metabolic Diseases. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2022, 2022. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35847596/>>. Acesso em: 12 jan. 2025.

HUERTA, Carlos et al. Characterization of novel small-molecule NRF2 activators: Structural and biochemical validation of stereospecific KEAP1 binding. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1860, n. 11 Pt A, p. 2537–2552, 1 nov. 2016a. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27474998/>>. Acesso em: 12 jan. 2025.

_____. Characterization of novel small-molecule NRF2 activators: Structural and biochemical validation of stereospecific KEAP1 binding. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, v. 1860, n. 11, p. 2537–2552, 1 nov. 2016b. Acesso em: 11 fev. 2025.

HUEY, Ruth; MORRIS, Garrett M; FORLI, Stefano. Using AutoDock 4 and AutoDock Vina with AutoDockTools: A Tutorial. 2012. Disponível em: <<http://autodock.scripps.edu.>>. Acesso em: 12 jan. 2025.

INCALZA, Maria Angela et al. Oxidative stress and reactive oxygen species in endothelial dysfunction associated with cardiovascular and metabolic diseases. **Vascular pharmacology**, v. 100, p. 1–19, 30 abr. 2018. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28579545/>>. Acesso em: 12 jan. 2025.

IVANOV, Alexander V.; BARTOSCH, Birke; ISAGULIANTS, Maria G. Oxidative Stress in Infection and Consequent Disease. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2017, p. 3496043, 2017. Disponível em: <<https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC5309413/>>. Acesso em: 10 fev. 2025.

JAIN, Akansha et al. Mitochondrial uncoupling proteins protect human airway epithelial ciliated cells from oxidative damage. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 121, n. 10, 5 mar. 2024. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38416686/>>. Acesso em: 12 jan. 2025.

JELIC, Marija Dragan et al. Oxidative stress and its role in cancer. **Journal of cancer research and therapeutics**, v. 17, n. 1, p. 22–28, 1 jan. 2021. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33723127/>>. Acesso em: 10 fev. 2025.

JOHNSON, William M.; WILSON-DELFOSSE, Amy L.; MIEYAL, John J. Dysregulation of glutathione homeostasis in neurodegenerative diseases. **Nutrients**, v. 4, n. 10, p. 1399–1440, 2012. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23201762/>>. Acesso em: 12 jan. 2025.

JOZEFCHUK, J.; ADJAYE, James. Quantitative real-time PCR-based analysis of gene expression. **Methods in enzymology**, v. 500, p. 99–109, 2011. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21943894/>>. Acesso em: 12 jan. 2025.

KAPLAN, Marielle; AVIRAM, Michael; HAYEK, Tony. Oxidative stress and macrophage foam cell formation during diabetes mellitus-induced atherogenesis: role of insulin therapy. **Pharmacology & therapeutics**, v. 136, n. 2, p. 175–185, nov. 2012. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22890211/>>. Acesso em: 12 jan. 2025.

KATTOOR, Ajoe John et al. Oxidative Stress in Atherosclerosis. **Current atherosclerosis reports**, v. 19, n. 11, 1 nov. 2017. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28921056/>>. Acesso em: 12 jan. 2025.

KE, Kun et al. The crosstalk effect between ferrous and other ions metabolism in ferroptosis for therapy of cancer. **Frontiers in oncology**, v. 12, 12 ago. 2022. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36033459/>>. Acesso em: 12 jan. 2025.

KHORASANI, Mahdiyeh Yaghooti et al. The role of curcumin and its derivatives in sensory applications. **Materials science & engineering. C, Materials for biological applications**, v. 103, 1 out. 2019. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31349416/>>. Acesso em: 12 jan. 2025.

KIM, Hyoncheol; XUE, Xiang. Detection of Total Reactive Oxygen Species in Adherent Cells by 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein Diacetate Staining. **Journal of visualized experiments : JoVE**, v. 2020, n. 160, p. 1–5, 1 jun. 2020. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32658187/>>. Acesso em: 12 jan. 2025.

KIM, So Hyung et al. Protective effect of esculetin against oxidative stress-induced cell damage via scavenging reactive oxygen species. **Acta pharmacologica Sinica**, v. 29, n. 11, p. 1319–1326, nov. 2008. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18954526/>>. Acesso em: 12 jan. 2025.

KLAUNIG, James E. Oxidative Stress and Cancer. **Current pharmaceutical design**, v.

24, n. 40, p. 4771–4778, 15 fev. 2018. Disponível em:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30767733/>. Acesso em: 10 fev. 2025.

KOCAAADAM, Betül; ŞANLIER, Nevin. Curcumin, an active component of turmeric (*Curcuma longa*), and its effects on health. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 57, n. 13, p. 2889–2895, 2 set. 2017. Disponível em:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26528921/>. Acesso em: 12 jan. 2025.

KONTOGHIORGHES, George J.; KONTOGHIORGHE, Christina N. Prospects for the introduction of targeted antioxidant drugs for the prevention and treatment of diseases related to free radical pathology. **Expert Opinion on Investigational Drugs**, v. 28, n. 7, p. 593–603, 3 jul. 2019. Acesso em: 19 nov. 2024.

KOTHA, Raghavendar R.; LUTHRIA, Devanand L. Curcumin: Biological, Pharmaceutical, Nutraceutical, and Analytical Aspects. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 24, n. 16, 13 ago. 2019. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31412624/>. Acesso em: 12 jan. 2025.

LI, Wan; SUN, Yongxin. Nrf2 is required for suppressing osteoclast RANKL-induced differentiation in RAW 264.7 cells via inactivating cannabinoid receptor type 2 with AM630. **Regenerative Therapy**, v. 14, p. 191, 1 jun. 2020. Disponível em:
<https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC7056625/>. Acesso em: 9 mar. 2025.

LI, Yupei et al. Alleviation of Oxidative Stress during Hemodialysis Sessions by Hemodialysis Membrane Innovation: A Multidisciplinary Perspective. **Blood purification**, v. 52, n. 11–12, p. 905–916, 1 dez. 2023. Disponível em:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37748453/>. Acesso em: 12 jan. 2025.

LIN, Xinyu et al. Curcumin attenuates oxidative stress in RAW264.7 cells by increasing the activity of antioxidant enzymes and activating the Nrf2-Keap1 pathway. **PloS one**, v. 14, n. 5, 1 maio 2019a. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31112588/>. Acesso em: 19 ago. 2024.

_____. Curcumin attenuates oxidative stress in RAW264.7 cells by increasing the activity of antioxidant enzymes and activating the Nrf2-Keap1 pathway. **PloS one**, v. 14, n. 5, 1 maio 2019b. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31112588/>. Acesso em: 10 fev. 2025.

LIU, Lyu ye et al. Network pharmacology, molecular docking and experimental study on the mechanism of Curcumin's anti-ferroptosis in melanocytes. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 736, 3 dez. 2024. Disponível em:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/39461013/>. Acesso em: 13 jan. 2025.

LOVAT, Robin; PREISER, Jean Charles. Antioxidant therapy in intensive care. **Current opinion in critical care**, v. 9, n. 4, p. 266–270, ago. 2003. Disponível em:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12883280/>. Acesso em: 12 jan. 2025.

LU, Chia Wen et al. Empagliflozin Attenuates Vascular Calcification in Mice with Chronic Kidney Disease by Regulating the NFR2/HO-1 Anti-Inflammatory Pathway through AMPK Activation. **International journal of molecular sciences**, v. 24, n. 12, 1 jun. 2023. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37373164/>>. Acesso em: 12 jan. 2025.

LU, Mengchen et al. Bivalent inhibitors of the BTB E3 ligase KEAP1 enable instant NRF2 activation to suppress acute inflammatory response. **Cell chemical biology**, v. 31, n. 6, p. 1188- 1202.e10, 20 jun. 2024. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38157852/>>. Acesso em: 13 jan. 2025.

LUO, Yongting et al. Macrophagic CD146 promotes foam cell formation and retention during atherosclerosis. **Cell research**, v. 27, n. 3, p. 352–372, 1 mar. 2017. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28084332/>>. Acesso em: 12 jan. 2025.

MACKOWIAK, Bryan et al. Alcohol-associated liver disease. **The Journal of clinical investigation**, v. 134, n. 3, 10 fev. 2024. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38299591/>>. Acesso em: 12 jan. 2025.

MADAMANCHI, Nageswara R.; VENDROV, Aleksandr; RUNGE, Marschall S. Oxidative stress and vascular disease. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 25, n. 1, p. 29–38, jan. 2005. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/51370591_Oxidative_Stress_and_Vascular_Disease>. Acesso em: 9 mar. 2025.

MAHDINIA, Elmira et al. Cellular crosstalk in atherosclerotic plaque microenvironment. **Cell communication and signaling : CCS**, v. 21, n. 1, 1 dez. 2023. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37254185/>>. Acesso em: 19 nov. 2024.

MARCOTTE, Douglas et al. Small molecules inhibit the interaction of Nrf2 and the Keap1 Kelch domain through a non-covalent mechanism. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 21, n. 14, p. 4011–4019, 15 jul. 2013. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23647822/>>. Acesso em: 12 jan. 2025.

MARINHO, Emanuelle Machado et al. Virtual screening based on molecular docking of possible inhibitors of Covid-19 main protease. **Microbial pathogenesis**, v. 148, 1 nov. 2020. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32619669/>>. Acesso em: 12 jan. 2025.

MarvinSketch and MarvinView: Molecule Applets for the World Wide Web | ChemAxon. Disponível em: <<https://chemaxon.com/blog/presentation/marvinsketch-and-marvinview-molecule-applets-for-the-world-wide-web>>. Acesso em: 12 jan. 2025.

MAYWALD, Martina; RINK, Lothar. Zinc in Human Health and Infectious Diseases. **Biomolecules**, v. 12, n. 12, 1 dez. 2022. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36551176/>>. Acesso em: 12 jan. 2025.

MÉNDEZ-GARCÍA, L. A. et al. Curcumin induces p53-independent inactivation of Nrf2

during oxidative stress-induced apoptosis. **Human and Experimental Toxicology**, v. 38, n. 8, p. 951–961, 1 ago. 2019. Disponível em: <https://journals.sagepub.com/doi/10.1177/0960327119845035?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori%3Arid%3Acrossref.org&rfr_dat=cr_pub++0pubmed>. Acesso em: 9 mar. 2025.

MING, Tianqi et al. Curcumin suppresses colorectal cancer by induction of ferroptosis via regulation of p53 and solute carrier family 7 member 11/glutathione/glutathione peroxidase 4 signaling axis. **Phytotherapy research : PTR**, v. 38, n. 8, p. 3954–3972, 1 ago. 2024. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38837315/>>. Acesso em: 13 jan. 2025.

MISHRA, Pallavi et al. Promoter sequence interaction and structure based multi-targeted (redox regulatory genes) molecular docking analysis of vitamin E and curcumin in T4 induced oxidative stress model using H9C2 cardiac cell line. **Journal of biomolecular structure & dynamics**, v. 40, n. 22, p. 12316–12335, 2022. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34463220/>>. Acesso em: 13 jan. 2025.

MOSLEY, Cara A.; LIOTTA, Dennis C.; SNYDER, James P. HIGHLY ACTIVE ANTICANCER CURCUMIN ANALOGUES. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 595, p. 77–103, 2007. Disponível em: <https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-0-387-46401-5_2>. Acesso em: 11 jan. 2025.

O que é citometria de fluxo? - Conhecimento - Elite Optoelectronics Co., Ltd. Disponível em: <<http://pt.oem-laser.com/info/what-is-flow-cytometry-57831817.html>>. Acesso em: 11 fev. 2025.

OLIVEIRA, M. et al. Hydrogen peroxide-induced secondary necrosis in conidia of *Aspergillus fumigatus*. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 62, n. 2, p. 95–101, 5 nov. 2015. Disponível em: <<https://cdnsciencepub.com/doi/10.1139/cjm-2015-0561>>. Acesso em: 9 mar. 2025.

OLIVEIRA, Sara et al. Curcumin derivatives for Type 2 Diabetes management and prevention of complications. **Archives of pharmacal research**, v. 43, n. 6, p. 567–581, 1 jun. 2020. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32557163/>>. Acesso em: 12 jan. 2025.

OOI, Theng Choon; MOHAMMAD, Nur Hafiza; SHARIF, Razinah. Zinc carnosine protects against hydrogen peroxide-induced DNA damage in WIL2-NS lymphoblastoid cell line independent of poly (ADP-Ribose) polymerase expression. **Biological trace element research**, v. 162, n. 1–3, p. 8–17, 27 nov. 2014. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25326781/>>. Acesso em: 12 jan. 2025.

PERRONE, Serafina et al. Molecular mechanisms of oxidative stress-related neonatal jaundice. **Journal of biochemical and molecular toxicology**, v. 37, n. 6, 1 jun. 2023. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37009732/>>. Acesso em: 12 jan. 2025.

PETTERSEN, Eric F. et al. UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. **Journal of computational chemistry**, v. 25, n. 13, p. 1605–1612, out. 2004. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15264254/>>. Acesso em: 12 jan. 2025.

POZNYAK, Anastasia et al. The Diabetes Mellitus-Atherosclerosis Connection: The Role of Lipid and Glucose Metabolism and Chronic Inflammation. **International journal of molecular sciences**, v. 21, n. 5, 1 mar. 2020. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32155866/>>. Acesso em: 12 jan. 2025.

QI, Hai-Liang et al. Curcumin ameliorates H₂O₂-induced inflammatory response in chondrocytes by inducing autophagy activation. **Experimental and therapeutic medicine**, v. 23, n. 4, 9 fev. 2022. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35251338/>>. Acesso em: 16 jan. 2025.

RADI, Rafael. Interplay of carbon dioxide and peroxide metabolism in mammalian cells. **The Journal of biological chemistry**, v. 298, n. 9, 1 set. 2022. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35961463/>>. Acesso em: 12 jan. 2025.

RECKELHOFF, Jane F.; ROMERO, Damian G.; YANES CARDOZO, Licy L. Sex, Oxidative Stress, and Hypertension: Insights From Animal Models. **Physiology (Bethesda, Md.)**, v. 34, n. 3, p. 178–188, 1 maio 2019a. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30968750/>>. Acesso em: 10 fev. 2025.

_____. Sex, Oxidative Stress, and Hypertension: Insights From Animal Models. **Physiology (Bethesda, Md.)**, v. 34, n. 3, p. 178–188, 1 maio 2019b. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30968750/>>. Acesso em: 12 jan. 2025.

SAHOO, Dipak Kumar et al. Oxidative stress, hormones, and effects of natural antioxidants on intestinal inflammation in inflammatory bowel disease. **Frontiers in endocrinology**, v. 14, 2023. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37701897/>>. Acesso em: 13 jan. 2025.

SALENTIN, Sebastian et al. PLIP: fully automated protein-ligand interaction profiler. **Nucleic acids research**, v. 43, n. W1, p. W443–W447, 2015. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25873628/>>. Acesso em: 12 jan. 2025.

SAMAL, Rashmi R. et al. Compromised conformation and kinetics of catalase in the presence of propylthiouracil: A biophysical study and alleviation by curcumin. **International journal of biological macromolecules**, v. 226, p. 1547–1559, 31 jan. 2023. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36455824/>>. Acesso em: 13 jan. 2025.

SANZ, Elisenda et al. RiboTag: Ribosomal Tagging Strategy to Analyze Cell-Type-Specific mRNA Expression In Vivo. **Current protocols in neuroscience**, v. 88, n. 1, 1 jun. 2019. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31216392/>>. Acesso em: 12 jan. 2025.

SCHIFFRIN, Bob et al. PyXlinkViewer: A flexible tool for visualization of protein chemical crosslinking data within the PyMOL molecular graphics system. **Protein Science**, v. 29, n. 8, p. 1851–1857, 1 ago. 2020. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/pro.3902>>. Acesso em: 12 jan. 2025.

SCHMIT, Taylor; KLOMP, Mitchell; KHAN, M. Nadeem. An Overview of Flow Cytometry: Its Principles and Applications in Allergic Disease Research. **Methods in Molecular Biology**, v. 2223, p. 169–182, 2021. Acesso em: 12 jan. 2025.

SENONER, Thomas; DICHTL, Wolfgang. Oxidative Stress in Cardiovascular Diseases: Still a Therapeutic Target? **Nutrients**, v. 11, n. 9, 1 set. 2019. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31487802/>>. Acesso em: 12 jan. 2025.

SHAHVALI, Sedigheh et al. The correlation between blood oxidative stress and sialic acid content in diabetic patients with nephropathy, hypertension, and hyperlipidemia. **Diabetology international**, v. 11, n. 1, p. 19–26, 1 jan. 2019. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31950000/>>. Acesso em: 14 jan. 2025.

SHAITO, Abdullah et al. Oxidative Stress-Induced Endothelial Dysfunction in Cardiovascular Diseases. **Frontiers in bioscience (Landmark edition)**, v. 27, n. 3, 1 mar. 2022. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35345337/>>. Acesso em: 12 jan. 2025.

SHIN, Jun Wan et al. Curcumin induces stabilization of Nrf2 protein through Keap1 cysteine modification. **Biochemical pharmacology**, v. 173, 1 mar. 2020. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31972171/>>. Acesso em: 19 nov. 2024.

SHITYAKOV, Sergey; FÖRSTER, Carola. In silico predictive model to determine vector-mediated transport properties for the blood-brain barrier choline transporter. **Advances and applications in bioinformatics and chemistry : AABC**, v. 7, n. 1, p. 23–36, 2014. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25214795/>>. Acesso em: 12 jan. 2025.

SIES, Helmut. Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine. **Redox biology**, v. 4, p. 180–183, 1 abr. 2015. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25588755/>>. Acesso em: 12 jan. 2025.

SILVA, Jacilene et al. Evaluation of the ADME, toxicological analysis and molecular docking studies of the anacardic acid derivatives with potential antibacterial effects against staphylococcus aureus. [s.d.]. Disponível em: <<http://medcraveonline.com>>. Acesso em: 12 jan. 2025.

SILVA, Matheus de Freitas et al. The Keap1/Nrf2-ARE pathway as a pharmacological target for chalcones. **Molecules**, v. 23, n. 7, 2018. Acesso em: 11 fev. 2025.

SIMIN KHATAEE et al. Synergistic inhibition of catalase activity by food colorants sunset yellow and curcumin: An experimental and MLSD simulation approach. **Chemico-biological interactions**, v. 311, 25 set. 2019. Disponível em:

<<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31301288/>>. Acesso em: 13 jan. 2025.

SOUZA, Gabriella B. et al. Synthesis of chalcone derivatives by Claisen-Schmidt condensation and in vitro analyses of their antiprotozoal activities. **Natural product research**, v. 38, n. 8, p. 1326–1333, 2024. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36331421/>>. Acesso em: 12 jan. 2025.

SUETH-SANTIAGO, Vitor et al. CURCUMINA, O PÓ DOURADO DO AÇAFRÃO-DA-TERRA: INTROSPECÇÕES SOBRE QUÍMICA E ATIVIDADES BIOLÓGICAS. **Química Nova**, v. 38, n. 4, p. 538–552, 1 maio 2015. Disponível em: <<https://www.scielo.br/j/qn/a/Jhxv6nxPhPXb37fh7bgZ3t/>>. Acesso em: 11 fev. 2025.

TAKEDA, Michio et al. Hydrogen peroxide induces necrosis, apoptosis, oncosis and apoptotic oncosis of mouse terminal proximal straight tubule cells. **Nephron**, v. 81, n. 2, p. 234–238, 1999. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9933761/>>. Acesso em: 9 mar. 2025.

TELEANU, Daniel Mihai et al. An Overview of Oxidative Stress, Neuroinflammation, and Neurodegenerative Diseases. **International journal of molecular sciences**, v. 23, n. 11, 1 jun. 2022a. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35682615/>>. Acesso em: 12 jan. 2025.

_____. An Overview of Oxidative Stress, Neuroinflammation, and Neurodegenerative Diseases. **International journal of molecular sciences**, v. 23, n. 11, 1 jun. 2022b. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35682615/>>. Acesso em: 19 nov. 2024.

TKACHEV, V. O.; MENSCHIKOVA, E. B.; ZENKOV, N. K. Mechanism of the Nrf2/Keap1/ARE signaling system. **Biochemistry. Biokhimia**, v. 76, n. 4, p. 407–422, 2011. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21585316/>>. Acesso em: 10 fev. 2025.

TOMEH, Mhd Anas; HADIANAMREI, Roja; ZHAO, Xiubo. A Review of Curcumin and Its Derivatives as Anticancer Agents. **International journal of molecular sciences**, v. 20, n. 5, 1 mar. 2019. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30818786/>>. Acesso em: 12 jan. 2025.

Trott, Oleg; Olson, Arthur J. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization and multithreading. **Journal of computational chemistry**, v. 31, n. 2, p. 455, 30 jan. 2010. Disponível em: <<https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC3041641/>>. Acesso em: 12 jan. 2025.

ULASOV, Alexey V. et al. Nrf2/Keap1/ARE signaling: Towards specific regulation. **Life sciences**, v. 291, 15 fev. 2022. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34732330/>>. Acesso em: 12 jan. 2025.

VAROL, Chen; MILDNER, Alexander; JUNG, Steffen. Macrophages: development and tissue specialization. **Annual review of immunology**, v. 33, p. 643–675, 21 mar. 2015.

Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25861979/>>. Acesso em: 10 fev. 2025.

WU, Jian Hui; BATIST, Gerald. Glutathione and glutathione analogues; therapeutic potentials. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1830, n. 5, p. 3350–3353, maio 2013. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23201199/>>. Acesso em: 12 jan. 2025.

XU, Zhen et al. Coenzyme Q10 Improves the Post-Thaw Sperm Quality in Dwarf Surfclam *Mulinia lateralis*. **Antioxidants (Basel, Switzerland)**, v. 13, n. 9, p. 1085, 4 set. 2024. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/39334744/>>. Acesso em: 12 jan. 2025.

YAMAMOTO, Masayuki; KENSLER, Thomas W.; MOTOHASHI, Hozumi. The KEAP1-NRF2 System: a Thiol-Based Sensor-Effector Apparatus for Maintaining Redox Homeostasis. **Physiological reviews**, v. 98, n. 3, p. 1169–1203, 1 jul. 2018. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29717933/>>. Acesso em: 12 jan. 2025.

YAN, Jiakai et al. α -Glucosidase inhibition by luteolin: Kinetics, interaction and molecular docking. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 64, p. 213–223, 1 mar. 2014. Acesso em: 12 jan. 2025.

YANG, Chunkun et al. Review of the Protective Mechanism of Curcumin on Cardiovascular Disease. **Drug design, development and therapy**, v. 18, p. 165–192, 2024. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38312990/>>. Acesso em: 19 nov. 2024.

YANG, Xiaobo; JIANG, Hong; SHI, Yao. Upregulation of heme oxygenase-1 expression by curcumin conferring protection from hydrogen peroxide-induced apoptosis in H9c2 cardiomyoblasts. **Cell & bioscience**, v. 7, n. 1, 21 abr. 2017. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28439402/>>. Acesso em: 16 jan. 2025.

YEH, Chao Hung et al. Baicalein Decreases Hydrogen Peroxide-Induced Damage to NG108-15 Cells via Upregulation of Nrf2. **Journal of cellular physiology**, v. 230, n. 8, p. 1840–1851, 1 ago. 2015. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25557231/>>. Acesso em: 12 jan. 2025.

YU, Chao; XIAO, Jian Hui. The Keap1-Nrf2 System: A Mediator between Oxidative Stress and Aging. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2021, 2021. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34012501/>>. Acesso em: 12 jan. 2025.

YUSUF, Dilmurat et al. An alternative method for the evaluation of docking performance: RSR vs RMSD. **Journal of chemical information and modeling**, v. 48, n. 7, p. 1411–1422, 2008. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18598022/>>. Acesso em: 12 jan. 2025.

ZANG, Wei Biao et al. Curcumin hybrid molecules for the treatment of Alzheimer's disease: Structure and pharmacological activities. **European journal of medicinal chemistry**, v. 265, 5 fev. 2024. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38134747/>>. Acesso em: 13 jan. 2025.

ZHA, Zheng et al. Potential Utility of Natural Products against Oxidative Stress in Animal Models of Multiple Sclerosis. **Antioxidants (Basel, Switzerland)**, v. 11, n. 8, 1 ago. 2022. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36009214/>>. Acesso em: 14 jan. 2025.

ZHANG, Hantao et al. Crosstalk between regulatory non-coding RNAs and oxidative stress in Parkinson's disease. **Frontiers in aging neuroscience**, v. 14, 9 ago. 2022. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36016854/>>. Acesso em: 14 jan. 2025.

ZHANG, Zenglei et al. Role of inflammation, immunity, and oxidative stress in hypertension: New insights and potential therapeutic targets. **Frontiers in immunology**, v. 13, 10 jan. 2023. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36703963/>>. Acesso em: 10 fev. 2025.

ZHOU, Xiaofang et al. Clinical Significance of HSCARG for Atherosclerotic Coronary Heart Disease and Reduced ROS-Oxidative Stress in in Vivo and in Vitro Models via p47phox by NF-κB Activity. **Brazilian journal of cardiovascular surgery**, v. 37, n. 5, p. 727–736, 2022. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35244380/>>. Acesso em: 12 jan. 2025.

ZIMMERMANN, Maya; MEYER, Norbert. Annexin V/7-AAD Staining in Keratinocytes. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, v. 740, p. 57–63, 2011. Disponível em: <https://link.springer.com/protocol/10.1007/978-1-61779-108-6_8>. Acesso em: 9 mar. 2025.