



RESSALVA

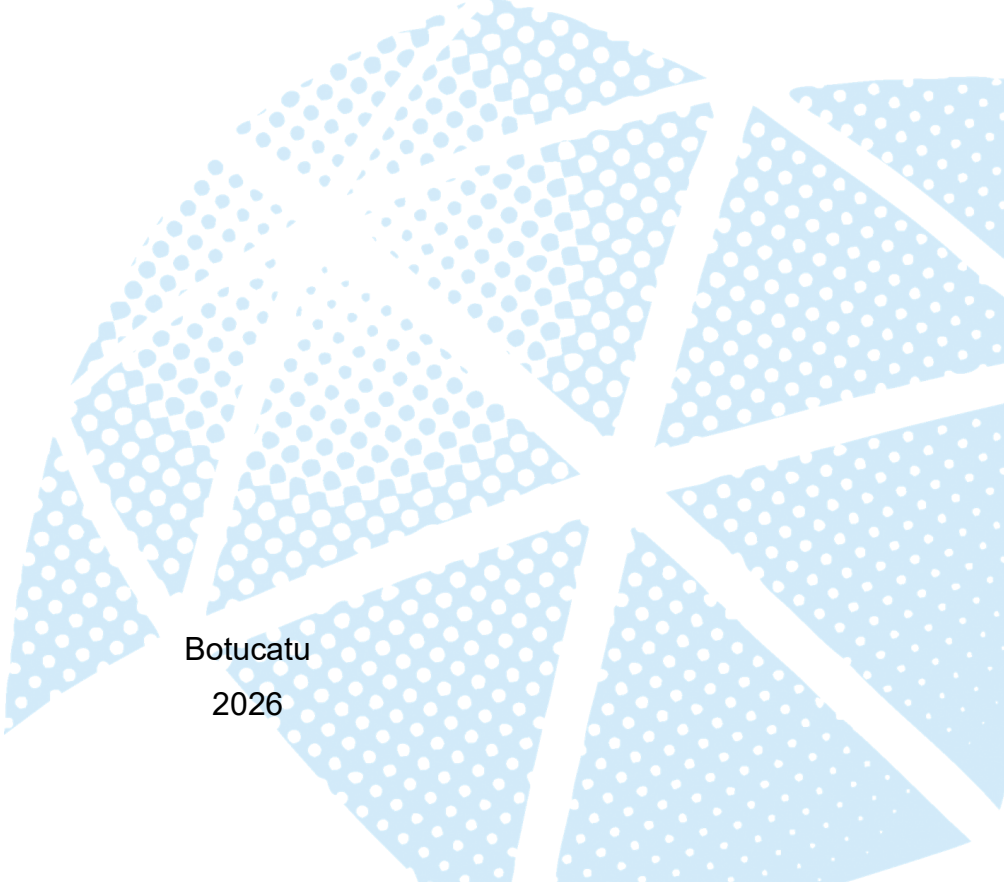
Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo deste documento será disponibilizado somente a partir de 25/03/2028.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
Instituto de Biociências - Campus de Botucatu

FELIPE LEONARDO FAGUNDES

**INVESTIGAÇÃO DA ATIVIDADE FARMACOLÓGICA DO CITRAL FRENTE À
COLITE COM RECIDIVAS EM RATOS MACHOS**

Botucatu
2026



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Júlio de Mesquita Filho”

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

INVESTIGAÇÃO DA ATIVIDADE FARMACOLÓGICA DO CITRAL FRENTE À COLITE COM RECIDIVAS EM RATOS MACHOS

Me. FELIPE LEONARDO FAGUNDES

Discente

Prof^a Dra. CLELIA AKIKO HIRUMA LIMA

Orientadora

Prof^a Dra. RAQUEL DE CÁSSIA DOS SANTOS

Co-Orientadora

Tese apresentada ao Instituto de Biotecnologia, Campus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Doutor no Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Área de concentração *Biomoléculas: Estrutura e função*.

Prof. Tit. Clelia Akiko Hiruma Lima

BOTUCATU – SP

2026

F156i Fagundes, Felipe Leonardo
Investigação da atividade farmacológica do Citral frente
à colite com recidivas em ratos machos / Felipe Leonardo
Fagundes. -- Botucatu, 2026
64 p. : fotos

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista
(UNESP), Instituto de Biociências, Botucatu
Orientadora: Clelia Akiko Hiruma Lima
Coorientadora: Raquel de Cássia dos Santos

1. colite. 2. inflamação. 3. ratos. 4. antioxidante. 5.
produtos naturais. I. Título.

Impacto Potencial desta pesquisa

Título da Tese: Investigação da atividade farmacológica do Citral frente à colite com recidivas induzida por TNBS em ratos machos.

Impacto científico, social e econômico: O presente estudo buscou compreender a resposta farmacológica ao Citral no contexto da colite com recidivas induzida por ácido 2,4,6 trinitrobenzeno sulfônico (TNBS). Os resultados obtidos fornecem evidências acerca dos efeitos do Citral em uma doença que está ganhando atenção no cenário epidemiológico mundial, bem como podem servir como base para a solicitação de patentes e contribuir para o desenvolvimento de um produto brasileiro que responda às especificidades da realidade local. Além disso, a proposta valoriza a pesquisa na área de produtos naturais, uma das bases da farmacologia moderna. Nesse sentido, o trabalho está alinhado com dois dos Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS) da Organização das Nações Unidas (ONU): (3) Saúde e bem-estar e (9) Indústria, Inovação e Infraestrutura.

Potential impact of this research

Thesis Title: Investigation of Citral pharmacological actions in the relapse colitis induced by TNBS in male rats.

Scientific, social and economic impact: The present study aims to understand the pharmacological response to Citral in the context of relapse colitis induced by 2,4,6 trinitro benzene sulfonic acid (TNBS). The results generated evidence about the effects of Citral in a disease that is gaining attention in the global epidemiological landscape, besides that could be the basis for a patent application and contribute for the development of a Brazilian product that addresses the local specificities. Moreover, the purpose highlights the research in Natural Products, the basis of modern pharmacology. In this sense, the work is aligned with two Sustainable Development Goals (SDG) from Organization of United Nations (ONU): (3) Global Health and Wellbeing and (9) Industry, innovation and infrastructure.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: INVESTIGAÇÃO DA ATIVIDADE FARMACOLÓGICA DO CITRAL FRENTE À COLITE COM RECIDIVAS EM RATOS MACHOS

AUTOR: FELIPE LEONARDO FAGUNDES

ORIENTADORA: CLELIA AKIKO HIRUMA LIMA

COORIENTADOR: COORIENTADORA: RAQUEL DE CÁSSIA DOS SANTOS

ORIENTADOR DE MOBILIDADE: EDUARDO J VILLABLANCA (Internacional)

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em Biologia Geral e Aplicada, área: Biomoléculas: Estrutura e Função pela Comissão Examinadora:

Profa. Titular CLELIA AKIKO HIRUMA LIMA (Participação Presencial)
Departamento de Biologia Estrutural e Funcional / UNESP / Câmpus de Botucatu - IBB

Prof. Dr. LUIZ GUSTAVO DE ALMEIDA CHUFFA (Participação Presencial)
Departamento de Biologia Estrutural e Funcional / UNESP / Câmpus de Botucatu - IBB

Prof. Dr. FÁBIO RODRIGUES FERREIRA SEIVA (Participação Presencial)
Departamento de Química e Bioquímica / UNESP / Câmpus de Botucatu - IBB

Profa. Dra. LIGIA YUKIE SASSAKI (Participação Presencial)
Departamento de Clínica Médica / UNESP / Câmpus de Botucatu - FMB

Prof. Dr. ANDERSON LUIZ FERREIRA (Participação Virtual)
Depto. de Ciências Biológicas / Universidade Federal de Catalão - GO

Botucatu, 25 de março de 2026.

Renan Codeco da Silva
Assistente Técnico Administrativo I da Seção Técnica de Pós-Graduação
Instituto de Biociências de Botucatu

Resumo

As doenças inflamatórias intestinais (DIIs) compreendem um conjunto de doenças crônicas e recidivantes. A etiologia é multifatorial e envolve a combinação de fatores como a pré-disposição genética e alterações na microbiota intestinal. O tratamento farmacológico é realizado com anti-inflamatórios e inibidores de vias de sinalização. Entretanto, esse conjunto terapêutico possui diversos efeitos colaterais e eficácia limitada. O Citral é um monoterpene encontrado em diversas espécies vegetais com atividade anti-inflamatória, antimicrobiana e analgésica. Desse modo, o objetivo desse estudo foi avaliar os possíveis efeitos farmacológicos do Citral em cultura 2D e 3D, bem como investigar a resposta *in vivo* do monoterpene no tratamento da colite com recidivas induzida por TNBS em ratos machos. Os efeitos na cultura 2D foram verificados através do ensaio de viabilidade celular e fechamento de ranhura em linhagem de epitélio de cólon Caco-2. Para verificar os efeitos *in vivo*, ratos Wistar machos de 8 semanas foram submetidos à administração intracolônica TNBS nos dias 1, 15 e 29. No 30º dia, os animais foram divididos em 6 grupos e tratados por 7 dias com Tween 80 a 1% (veículo), Sulfassalazina 100 mg/kg, Citral (25, 100 e 300 mg/kg) e grupo sham. Os resultados foram expressos na forma de média $\pm$ erro padrão e a significância estatística foi determinada usando ANOVA paramétrica ou não paramétrica seguida pelos testes *à posteriori* mais adequados. O tratamento com o Citral nas concentrações de 40 e 80 μ M demonstrou atividade proliferativa em células Caco-2 no tempo de 48h, resultado confirmado pelo ensaio de fechamento de ranhura. Os resultados *in vivo* mostraram que as doses de 100 e 300 mg/kg do monoterpene foram capazes de prevenir a perda de peso e reduzir significativamente a severidade das lesões macroscópicas determinadas pelo *score* de Bell. O tratamento com Citral também reduziu a atividade do marcador MPO, mas não alterou significativamente os parâmetros SOD, CAT, GSH e MMP-2. Na cultura de organoides, o monoterpene promoveu redução do número e da área dos organoides de cólon em todas as concentrações testadas. O conjunto dos resultados apresentados demonstra o potencial terapêutico do Citral na colite, entretanto, novas análises são necessárias para elucidar os mecanismos de ação.

Palavras-chave: Citral, colite ulcerativa, anti-inflamatório, antioxidante.

Abstract

The inflammatory bowel disease comprehends a broad spectrum of chronic and relapsing diseases that affects the gastrointestinal tract and has a prevalence of 7 million cases world wide. The etiology is unknown but involves an interplay with genetic predisposition and gut microbiota alterations. The pharmacological treatment is based on anti-inflammatory drugs and signaling pathway inhibitors. Otherwise, those drugs have adverse effects and limited efficacy. Citral is a monoterpene found in some vegetal species with anti-inflammatory, antimicrobial and analgesic effect. The aim of this project is evaluating the possible pharmacological citral effects in 2D and 3D culture, besides investigates the *in vivo* response in the treatment of relapse colitis induced by TNBS in male and female rats. The effects in 2D culture were investigated by cellular viability and scratch assay in colon epithelial lineage Caco-2. The *in vivo* effects were verified in male Wistar rats with 8 weeks old were submitted to intracolonic administration of 3 mg TNBS solubilized in 50% ethanol. The procedure was repeated in day 1st, 15th and 29th. In the 30th day, animals were divided in 6 different groups and treated for 7 days with Tween 80 1%, Sulfasalazine 100 mg/kg, Citral (25, 100 and 300 mg/kg) and sham group. The results were expressed as mean $\pm$ standard error and the statistical significance was determined using parametric or non-parametric ANOVA followed by adequate *a posteriori* tests. *In vitro*, the treatment with Citral at 40 μ M and 80 μ M concentrations demonstrated a proliferative action at 48h in Caco-2 cells, result confirmed by the scratch assay. The *in vivo* treatment showed that Citral at 100 mg/kg and 300 mg/kg doses was capable to revert the weight loss and the severity of macroscopic lesion measured by the Bell score. The Citral treatment reduced the activity of the inflammatory biomarker MPO, but did not change (SOD, CAT, GSH and MMP-2). In the organoid culture, Citral promoted reduction in the organoid number and area in all tested concentrations. Together, the results demonstrated the pharmacological potential of Citral, however, new analysis is necessary to elucidate the mechanisms of action.

Key words: citral, ulcerative colitis, anti-inflammatory, antioxidant.

Agradecimentos

Quero começar essa seção agradecendo aos meus pais e avó pela criação e estímulo aos estudos. Obrigado por acreditarem na minha educação e por me ajudarem sempre que possível. Nesse sentido, gostaria de agradecer à todas as pessoas que um dia me sonharam, com destaque à todos os meus professores. Obrigado por despertarem em mim a curiosidade científica e o gosto de pelas artes, capacidades fundamentais para meu desenvolvimento científico e humano. Queria destacar entre muitos nomes, alguns professores da ETEC Rosa Perrone Scavone que fizeram parte dessa trajetória: Ângela Maria Sesti Minutti, Márcio Adriano Bredariol e Tatiane Porfíria.

Agradeço à minha irmã Bruna e aos meus melhores amigos Thalia e Freddy, a companhia de vocês foi fundamental na caminhada da vida. Sou a pessoa mais feliz do mundo por ter vocês ao meu lado.

À minha orientadora Dra. Clelia Akiko Hiruma Lima por ter aberto às portas do seu laboratório para me receber. Obrigado pela paciência, correções, conselhos e conversas. Aprendi muito com a senhora e sou grato pelo treinamento científico de alto nível que experimentei no laboratório.

À minha co-orientadora Dra. Raquel de Cássia dos Santos. Obrigado pela orientação durante minha trajetória na Unesp e também na Universidade São Francisco. Agradeço a generosidade de me ensinar as bases da atividade científica e me orientar nesses anos de formação.

À professora Dra. Flávia Dellela e seus alunos pelo auxílio nos experimentos de cultura celular. Agradeço à gentileza, disponibilidade e carinho com que me receberam no setor de morfologia e por acreditarem no potencial do Citral.

Gostaria de agradecer à equipe do Laboratório de Ensaio Biológicos com Produtos Naturais pela companhia do dia-a-dia, auxílio nos experimentos e suporte emocional. Obrigado Felipinho, Gabi, Malu, Bruno, Isa, Mari, Renata, Maycon e Juliana. Trabalhar com vocês me fez crescer como pessoa e pesquisador.

Ao professor Dr. Eduardo Javier Villablanca que me recebeu no Karolinska Institutet e aos meus amigos da Suécia: Angie (Dr. Basabe), Johan (Karl), Maria, Xinxin (Dr. Luo), Ali, Francisca, Kim, Lisa, Martín, Gustavo e Yuhao. Agradeço também aos amigos que Estocolmo

me proporcionou: Henrique, Hadder, Dimi, Henver, Paulo, Ivy, Daniel e Tati. Vocês transformaram esse intercâmbio na experiência mais incrível da minha vida.

Agradeço aos servidores da Universidade Estadual Paulista Luciana Borgatto, Davi, Renan, Juliana, Olga e Maria Vitória pelo suporte acadêmico durante o doutorado. Faço menção ao técnico do setor de fisiologia Juliano Muraoka e do setor de morfologia Keila e Ricardo por me ajudarem na manutenção dos animais de experimentação e na confecção de lâminas histológicas. Sem a ajuda de vocês, essa pesquisa não seria possível.

Agradeço à Capes (88887.686249/2022-00 e 88887.689603/2022-00) e à FAPESP (2022/02730-5 e 2024/01427-2) pela concessão das bolsas de estudos que permitiram minha dedicação integral à pesquisa. Agradeço ao CNPq pela concessão de auxílio à minha orientadora (311957/2020-0 e 305858/2025-4) e a Universidade Estadual Paulista-UNESP pela infraestrutura institucional oferecida.

Prólogo

A realização da presente tese possibilitou a participação em conferências nacionais e internacionais, envolvimento em atividades de difusão e divulgação científica e co-autoria de artigos científicos, processos que enriqueceram a formação científica e cidadã oferecida pela universidade pública brasileira.

Atividades desenvolvidas durante o doutorado

Participação em eventos científicos

Nacionais

- 57º Congresso da Sociedade Brasileira de Farmacologia e Terapêutica Experimental, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil, 2025
- 9º Conferência Brasileira de Produtos Naturais (BCNP), Universidade Federal da Bahia, Salvador, Brasil, 2023
- 54º Congresso da Sociedade Brasileira de Farmacologia e Terapêutica Experimental, virtual, Brasil, 2022

Internacionais

- Center of Molecular Medicine-Reserch Day, Stockholm, Sweden, 2025
- Immaging in cell and molecular biology, Uppsala University, Uppsala, Sweden, 2025
- Oral Gut Conference 2, Karolinska Institutet, Stockholm, Sweden, 2024
- Sci Life lab Seminar, Solna, Sweden, 2024

Trabalhos apresentados

- Antinociceptive action of citral through the CB2 receptor is more pronounced in obese adult male C57BL/6J mice. Felipe Lima Dario, Maria Luiza Alves Aquino, **Felipe Leonardo Fagundes**, Maycon Tavares Emílio-Silva, Laura Vitória Fortunato de Oliveira, Isabela Galende Guidolin, Gabriela Bueno, Mariana Moraes Fioravanti, Renata Assunção, Vinícius Peixoto Rodrigues, Lúcia Regina Machado da Rocha, Clelia Akiko Hiruma Lima. XXXVIII Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental (FeSBE). Universidade Estadual de Campinas, Campinas, Brasil, 2024.
- Activity of free and nanoemulsified myrcene in modulating ulcerative colitis induced by dextran sodium sulfate in adult C57BL/6J male mice: the involvement of antioxidant mechanism. Isabela Galende Guidolin, Vinícius Peixoto Rodrigues, Maycon Tavares Emílio Silva, Felipe Lima Dario, Gabriela Bueno, Jonatas Lobato Duarte, Laura Vitória Fortunato de Oliveira, Mariana Moraes Fioravanti, **Felipe Leonardo Fagundes**, Marlus Chorilli e Clelia Akiko Hiruma Lima. XXXVIII Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental (FeSBE). Universidade Estadual de Campinas, Campinas, Brasil, 2024.
- Evaluation of antinociceptive and anti-inflammatory effects of citral on obese adult male C57BL/6J mice. Maria Luiza Alves Aquino, Felipe Lima Dario, **Felipe Leonardo Fagundes**, Maycon Tavares Emílio Silva, Laura Vitória Fortunato de Oliveira, Isabela Galende Guidolin, Gabriela Bueno, Mariana Moraes Fioravanti, Renata Assunção, Vinícius Peixoto Rodrigues, Lúcia Regina Machado da Rocha e Clelia Akiko Hiruma Lima. XXXVIII Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, Brasil, 2024.
- Hepatoprotective effect of citral against injury caused by metabolic endotoxemia in adult male C57BL/6J mice fed with a high-fat diet. Mariana Moraes Fioravanti, Maycon Tavares Emílio Silva, Felipe Lima Dario, Vinícius Peixoto Rodrigues, Gabriela Bueno, **Felipe Leonardo Fagundes**, Laura Vitória Fortunato de Oliveira, Isabela Galende Guidolin e Clelia Akiko Hiruma Lima. XXXVIII Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, Brasil, 2024.

- The role of myrcene in obesity associated with colitis induced by dextran sodium sulfate (DSS) in C57BL/J6 male mice. Gabriela Bueno, Maycon Tavares Emílio Silva, **Felipe Leonardo Fagundes**, Vinícius Peixoto Rodrigues, Felipe Lima Dario, Laura Vitória Fortunato de Oliveira, Isabela Galende Guidolin, Maria Luiza Alves Aquino, Mariana Moraes Fioravanti, Lúcia Regina Machado da Rocha e Clelia Akiko Hiruma Lima. XXXVIII Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental (FeSBE). Universidade Estadual de Campinas, Campinas, Brasil, 2024.
- Mirceno pode melhorar o quadro de retocolite ulcerativa agravada por dieta hiperlipídica em camundongos C57BL/J6 machos? Laura Vitória Fortunato de Oliveira, Gabriela Bueno; Maycon Tavares Emílio-Silva, Felipe Lima Dario, **Felipe Leonardo Fagundes** e Clelia Akiko Hiruma Lima. 23ª Jornada da Nutrição da UNESP de Botucatu (JONUB). UNESP, Botucatu, Brasil, 2024.
- Efeito do mirceno livre e nanoemulsionado na retocolite ulcerativa induzida por dextran sulfato de sódio em camundongos machos C57BL/6J. Isabela Galende Guidolin, Vinícius Peixoto Rodrigues, Maycon Tavares Emílio-Silva, Felipe Lima Dario, **Felipe Leonardo Fagundes**, Gabriela Bueno e Clelia Akiko Hiruma Lima. 23º Jornada da Nutrição da UNESP de Botucatu (JONUB). UNESP, Botucatu, Brasil, 2024.
- Citral has antiobesogenic activity improving adipose tissue endocrine function of high-fat diet-induced obesity mice. Felipe Lima Dario, Priscila Romano Raimundo, Loreana Sanches Silveira, Maycon Tavares Emílio-Silva, Vinícius Peixoto Rodrigues, **Felipe Leonardo Fagundes**, Gabriela Bueno, José Cesar Rosa Neto, Lúcia Regina Machado da Rocha, Clelia Akiko Hiruma Lima. 9th Brazilian Conference on Natural Products (BCNP). Universidade Federal da Bahia. Salvador, Brasil, 2023.
- Anti-inflammatory and antioxidant effect of Citral during the colitis with relapses induced by trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS) in rats. **Felipe Leonardo Fagundes**, Felipe Lima Dario, Maycon Tavares Emílio-Silva, Gabriela Bueno, Priscila Romano Raimundo, Vinícius Peixoto Rodrigues, Lucia Regina Machado da Rocha, Raquel de Cássia dos Santos, Clelia Akiko Hiruma Lima. 9th Brazilian Conference on Natural Products (BCNP). Universidade Federal da Bahia. Salvador, Brasil, 2023.
- The effect of myrcene nanoemulsion on the modulation of oxidative stress in ulcerative colitis induced by dextran sodium sulfate in mice. Vinícius Peixoto Rodrigues, Isabela

Galende Guidolin, Maycon Tavares Emílio Silva, Felipe Lima Dario, Gabriela Bueno, Jonatas Lobato Duarte, **Felipe Leonardo Fagundes**, Marlus Chorilli, Clelia Akiko Hiruma-Lima. 9th Brazilian Conference on Natural Products (BCNP). Universidade Federal da Bahia. Salvador, Brasil, 2023.

Menções honrosas

- Apresentação de painel - Antinociceptive action of citral through the CB2 receptor is more pronounced in obese adult male C57BL/6J mice. Felipe Lima Dario, Maria Luiza Alves Aquino, **Felipe Leonardo Fagundes**, Maycon Tavares Emílio-Silva, Laura Vitória Fortunato de Oliveira, Isabela Galende Guidolin, Gabriela Bueno, Mariana Moraes Fioravanti, Renata Assunção, Vinícius Peixoto Rodrigues, Lúcia Regina Machado da Rocha e Clelia Akiko Hiruma Lima. XXXVIII Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental (FeSBE). Universidade Estadual de Campinas, Campinas, Brasil, 2024.
- Apresentação oral - Efeito do mirceno livre e nanoemulsionado na retocolite ulcerativa induzida por dextran sulfato de sódio em camundongos machos C57BL/6J. Isabela Galende Guidolin, Vinícius Peixoto Rodrigues, Maycon Tavares Emílio-Silva, Felipe Lima Dario, **Felipe Leonardo Fagundes**, Gabriela Bueno e Clelia Akiko Hiruma Lima. 23^o Jornada da Nutrição da UNESP de Botucatu (JONUB). UNESP, Botucatu, Brasil, 2024.
- Apresentação de painel - Citral has antiobesogenic activity improving adipose tissue endocrine function of high-fat diet-induced obesity mice. Felipe Lima Dario, Priscila Romano Raimundo, Loreana Sanches Silveira, Maycon Tavares Emílio-Silva, Vinícius Peixoto Rodrigues, **Felipe Leonardo Fagundes**, Gabriela Bueno, José Cesar Rosa Neto, Lúcia Regina Machado da Rocha, Clelia Akiko Hiruma Lima. 9th Brazilian Conference on Natural Products (BCNP). Universidade Federal da Bahia. Salvador, Brasil, 2023.
- Apresentação de painel - Investigation of proliferative potential of monoterpene Citral in lineage of intestinal cells Caco-2. **Felipe Leonardo Fagundes**, Melina Luzzi Zarricueta, Gabriel Henrique Caxali, Mirian Carolini Esgoti Aal, Flávia Karina Delella,

Clelia Akiko Hiruma Lima. 54º Congresso da Sociedade Brasileira de Farmacologia e Terapêutica Experimental. Evento virtual, Brasil, 2022.

Artigos publicados

- Fioretto MN, Barata LA, de Andrade Felipe VA, Dos Santos SAA, Maciel FA, Ribeiro IT, et al. Long-term effects of maternal protein restriction on adrenal proteomic profile and steroidogenesis in male offspring rats. *Cell Signal*. 2025;130:111707. (JCR₂₀₂₄ 3.7)
- Franzolin AML, Fioretto MN, Ribeiro IT, Maciel FA, Barata LA, Vitali PM, et al. Maternal protein restriction compromises hepatic phenotype and antioxidant defense in postweaning male rats, while females exhibit resilience. *Biochem Biophys Res Commun*. 2025;766:151873. (JCR₂₀₂₄ 2.2)
- Zanesco MC, Yoshitani MM, **Fagundes FL**, Campos FG, Pereira PP, Pereira QC, et al. Enemas with sucralfate and n-acetylcysteine can reduce inflammation and oxidative stress in colonic mucosa without fecal stream. *Acta Cir Bras*. 2025;40:e406325. (JCR₂₀₂₄ 1.3)
- Sobrinho Lemos L, Naia Fioretto M, Tenori Ribeiro I, Annibal Barata L, Alessandra Maciel F, **Leonardo Fagundes F**, et al. Maternal Protein Restriction promotes Cardiac Disorders by Disrupting Heart Developmental Morphophysiology in Young Male Offspring Rats. *Exp Cell Res*. 2025:114795. (JCR₂₀₂₄ 3.5)
- Machado GF, Pereira QC, **Fagundes FL**, Emilio-Silva MT, Rodrigues VP, Patino MA, et al. The Anthocyanidins Malvidin and Cyanidin Alleviate Irinotecan-Triggered Intestinal Mucositis by Modulating Oxidative Stress and Cytokine Release. *Int J Mol Sci*. 2025;26(21). (JCR₂₀₂₄ 4.9)
- Zarricueta ML, **Fagundes FL**, Pereira QC, Pantaleao SQ, Santos RCD. Relationship between Hormonal Modulation and Gastroprotective Activity of Malvidin and Cyanidin Chloride: In Vivo and In Silico Approach. *Pharmaceutics*. 2022;14(3). (JCR₂₀₂₄ 5.5)
- **Fagundes FL**, Pereira QC, Zarricueta ML, dos Santos RdC. Malvidin Protects against and Repairs Peptic Ulcers in Mice by Alleviating Oxidative Stress and Inflammation. *Nutrients*. 2021;13(10):3312. (JCR₂₀₂₄ 5.0)

Atividades de extensão

- Monitor do curso de férias: Difundindo e popularizando a ciência na Unesp - Interação entre a Pós-Graduação e o Ensino básico (Reprodução de A à Z), 90h, Unesp, Botucatu, 2023

Intercâmbio

- Bolsa estágio pesquisa no exterior (BEPE) realizada no Departamento de Medicina, Divisão de Medicina Respiratória e Alergia do Karolinska Institutet, Estocolmo, Suécia, sob supervisão do Dr. Eduardo Javier Villablanca (31/05/2024 à 30/05/2025).

Representação em colegiados

- Suplente da representação discente junto à Comissão Permanente de Pesquisa do Instituto de Biociências, Unesp, Botucatu, 2021-2022

Atividades de ensino

- Estágio docência pelo Programa de Atividades e Aperfeiçoamento em Docência no Ensino Superior (PAADES) na disciplina de Fisiologia Humana (3h) sob responsabilidade da Prof. Dra. Clelia Akiko Hiruma Lima, Departamento de Biologia Estrutural e Funcional, do Instituto de Biociências de Botucatu, UNESP

Disciplinas cursadas

- Carcinogênese experimental – 3 créditos – Conceito A
- O cientista e o professor universitário – 2 créditos – Conceito A
- Tópicos especiais em biologia geral e aplicada – 2 créditos – Conceito A
- Tópicos especiais em biologia geral e aplicada “Making sense of Omics: Generation, analysis and integration of large datasets” – 3 créditos – Conceito A
- Imunomodulação por produtos naturais – 6 créditos – Conceito A
- Tópicos especiais em biometria – Introdução à bioestatística no programa R – 2 créditos – Conceito A
- Tópicos especiais em Biotecnologia: análises computacionais de single cell data (sc-RNA-Seq e ATAC-Seq) – 1 crédito – Conceito A

- Tópicos especiais em Biologia Geral e aplicada: Toxinologia básica e aplicada (biotecnologias de toxinas úteis à saúde humana e animal) – 4 créditos – Conceito A
- Tópicos especiais em Farmacologia e Biotecnologia: bioinformática estrutural aplicada à biomoléculas – 3 créditos – Conceito A
- Cultura celular animal – 3 créditos – Conceito A
- Prática pedagógica no ensino superior (II): recursos de ensino aprendizagem – 3 créditos – Conceito A
- Tópicos especiais em biologia geral e aplicada: Conceitos e aplicações do conceito DOHaD – 1 crédito – Conceito A
- Interação entre a pós-graduação e o ensino básico de ciências e biologia – 6 créditos – Conceito A
- Tópicos especiais: tópicos em biossegurança e organismos geneticamente modificados (OGMs e AnGMs) – 1 crédito – Conceito A

Sumário

Apresentação.....	17
Introdução	18
Objetivos	23
Objetivos específicos	23
Referências bibliográficas.....	24
Perspectivas futuras	63
Anexo 1	64

Lista de abreviaturas

AIEC – *Escherichia coli* entero invasiva
CAT – Catalase
CLND-4 – Claudina 4
DC – Doença de Crohn
DII – Doença inflamatória intestinal
DSS – Dextran sulfato de sódio
EO – Estresse oxidativo
GSH – Glutathione reduzida
IL-1 β – Interleucina 1 beta
ILC – Células linfoides inatas
KO – Knock-out
LOO – Radical peroxila
LOOH – Radical hidroperoxila
MDA – Malondialdeído
MMP-2 – Metaloproteinase de matriz 2
MMP-9 – Metaloproteinase de matriz 9
NF- κ B – Fator nuclear kappa B
NOD – Domínios de oligomerização de nucleotídeos
OCLN – Ocludina
PAMP – Padrões moleculares associados aos patógenos
PRR – Receptores de reconhecimento de padrão
RCU – Retocolite ulcerativa
SOD – Superóxido dismutase
T_H – Linfócitos T auxiliares
TLR – Receptores tipo toll
TNBS – Ácido 2,4,6 trinitrobenzenosulfônico
TNF- α – Fator de necrose tumoral alfa
ZO-1 – Zônula ocludens 1

Apresentação

Essa tese foi estruturada na forma de capítulos, sendo precedida por uma revisão bibliográfica sobre as doenças inflamatórias intestinais e descrição das propriedades farmacológicas do Citral. O **capítulo I** é apresentado na forma de artigo que será enviado à revista científica *Biomedicine & Pharmacotherapy* contendo os resultados do Citral em cultura de células e no modelo de colite com recidivas em ratos machos.

Introdução

A DII é uma enfermidade de curso crônico e recidivante que acomete todo o trato gastrointestinal. Clinicamente, pode ser dividida em Doença de Crohn (DC), retocolite ulcerativa (RCU) e outras condições menos prevalentes (1). A inflamação da mucosa intestinal na DII é caracterizada por episódios de dor abdominal, diarreia, perda de peso e o ativação de células como neutrófilos e macrófagos que produzem citocinas pró-inflamatórias, enzimas proteolíticas e radicais livres favorecendo a degradação tecidual e a ulceração nos tecidos atingidos (2). Células do sistema imune inato desempenham papel central no desenvolvimento e progressão das DII. Na DC, a inflamação pode atingir qualquer segmento do trato gastrointestinal, enquanto na RCU a inflamação é limitada ao reto e segmentos ascendentes do intestino grosso. As duas doenças podem ser diferenciadas quanto ao perfil de células inflamatórias e pelos achados histológicos. Na DC, observa-se inflamação severa que leva a descontinuidade da barreira mucosa, abscessos, estenoses e fístulas. Já na RCU, a inflamação é superficial, limitada a mucosa e submucosa com presença de abscessos de criptas (2, 3).

A prevalência da DII é diferenciada considerando-se as várias regiões geográficas, mas de forma geral, países europeus e os Estados Unidos apresentam índices elevados tanto de RCU quanto de DC com aproximadamente 1 milhão de pacientes nos EUA e 2.5 milhões na União Europeia (4). A incidência anual varia de acordo com a região geográfica e pode atingir 46 casos a cada 100.000 habitantes na Europa e 30 casos por 100.000 habitantes na América do Norte (5). No Brasil, dados epidemiológicos acerca das DII são subestimados, contudo, levantamento realizado em hospitais do nordeste brasileiro entre os anos de 2020-2021 demonstraram uma prevalência maior de RCU (62%) quando comparadas à DC (38%) com predomínio do sexo feminino para ambas as condições (6).

A origem das DII não está totalmente estabelecida, entretanto, sabe-se que componentes genéticos e ambientais são a causa da inflamação recorrente observada durante o curso da doença (1). Fatores como estresse, tabagismo, ingestão de dieta rica em gordura saturada e alterações na microbiota estão associados ao desenvolvimento das DII (7). A obesidade, uma condição que está crescendo na atualidade, desempenha um papel chave na gênese e no curso da doença, particularmente no caso dos portadores de DC (8-10). A DII está associada a várias comorbidades, como síndrome metabólica, doenças cardiovasculares, aterosclerose, disfunção sexual e mal de Parkinson (11).

Como as DIIs possuem curso crônico e recidivante sabe-se que tanto a imunidade inata, quanto a imunidade adaptativa participam da fisiopatologia da doença, somadas aos fatores anteriormente listados (12). Tal combinação resulta em uma resposta exacerbada das células de defesa com participação de produtos microbianos e base genética (13, 14). De forma resumida, a homeostase intestinal se fundamenta no pleno funcionamento dos componentes celulares como macrófagos, células dendríticas, neutrófilos e eosinófilos que estão presentes na camada de muco no intestino e exercem um papel protetor contra antígenos luminiais. Tais células expressam receptores de reconhecimento de padrão (PRR), como os receptores tipo toll (TLR) e os domínios de oligomerização de nucleotídeos (NOD) que reconhecem os padrões moleculares associados aos patógenos (PAMPs), presentes nas superfícies microbianas, e desencadeiam respostas efetoras com objetivo de erradicar os patógenos (15, 16).

Uma vez ativados pela presença de PAMPs, os PRR, levam à transcrição de diversos genes que estimulam a produção de citocinas e ativação da resposta celular local com consequente recrutamento de linfócitos T CD4⁺. Na RCU, existe uma atividade descontrolada de células T_{H2}, com produção das interleucinas 4, 5 e 13 (IL-4, IL-5, IL-13). Tais mediadores, principalmente IL-13, produzidas por linfócitos T_H e células linfoides inatas (ILC) possuem efeitos diretos sobre a função de barreira. Essas citocinas aumentam a permeabilidade das células intestinais e causam apoptose dos enterócitos, contribuindo com os danos celulares observados no curso das DIIs (17, 18). Outras citocinas, como IL-1 β e fator de necrose tumoral alfa (TNF)- α , produzidas principalmente por macrófagos ativados, contribuem para amplificar a inflamação observada no intestino e desregular a montagem das junções de oclusão no epitélio intestinal (19, 20).

References

1. Bruner LP, White AM, Proksell S. Inflammatory Bowel Disease. Prim Care. 2023;50(3):411-27.
2. Wang S, Dong Z, Wan X. Global, regional, and national burden of inflammatory bowel disease and its associated anemia, 1990 to 2019 and predictions to 2050: An analysis of the global burden of disease study 2019. Autoimmun Rev. 2024;23(3):103498.
3. Christensen C, Knudsen A, Arnesen EK, Hatlebakk JG, Sletten IS, Fadnes LT. Diet, Food, and Nutritional Exposures and Inflammatory Bowel Disease or Progression of Disease: an Umbrella Review. Adv Nutr. 2024;15(5):100219.
4. Gros B, Kaplan GG. Ulcerative Colitis in Adults: A Review. JAMA. 2023;330(10):951-65.
5. Guo A, Ostensson M, Stordal K, Ludvigsson J, Marild K. Early-Life Hygiene-Related Factors and Risk of Inflammatory Bowel Disease: A Scandinavian Birth Cohort Study. Inflamm Bowel Dis. 2023.
6. de Brito CAA, Celani LMS, de Araujo MVT, de Lucena MT, Vasconcelos GBS, Lima GAS, et al. A Multicentre Study of the Clinical and Epidemiological Profile of Inflammatory Bowel Disease in Northeast Brazil. Clin Exp Gastroenterol. 2023;16:87-99.
7. Ananthakrishnan AN. Epidemiology and risk factors for IBD. Nat Rev Gastroenterol Hepatol. 2015;12(4):205-17.
8. Vieujean S, Jairath V, Peyrin-Biroulet L, Dubinsky M, Iacucci M, Magro F, et al. Understanding the therapeutic toolkit for inflammatory bowel disease. Nat Rev Gastroenterol Hepatol. 2025.
9. Villablanca EJ, Selin K, Hedin CRH. Mechanisms of mucosal healing: treating inflammatory bowel disease without immunosuppression? Nat Rev Gastroenterol Hepatol. 2022;19(8):493-507.
10. Kolozsvarine Nagy J, Moricz AM, Boszormenyi A, Ambrus A, Schwarczinger I. Antibacterial effect of essential oils and their components against *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* revealed by microdilution and direct bioautographic assays. Front Cell Infect Microbiol. 2023;13:1204027.

11. Balusamy SR, Ramani S, Natarajan S, Kim YJ, Perumalsamy H. Integrated transcriptome and in vitro analysis revealed anti-proliferative effect of citral in human stomach cancer through apoptosis. *Sci Rep*. 2019;9(1):4883.
12. Nishijima CM, Ganey EG, Mazzardo-Martins L, Martins DF, Rocha LR, Santos AR, et al. Citral: a monoterpene with prophylactic and therapeutic anti-nociceptive effects in experimental models of acute and chronic pain. *Eur J Pharmacol*. 2014;736:16-25.
13. Xia L, Li R, Tao T, Zhong R, Du H, Liao Z, et al. Therapeutic potential of *Litsea cubeba* essential oil in modulating inflammation and the gut microbiome. *Front Microbiol*. 2023;14:1233934.
14. Yu L, Zhou Y, Chen Y, Wang Y, Gu Q, Song D. Antifungal activity and mechanism of *Litsea cubeba* (Lour.) Persoon essential oil against the waxberry spoilage fungi *Penicillium oxalicum* and its potential application. *Int J Food Microbiol*. 2023;411:110512.
15. Emilio-Silva MT, Rodrigues VP, Bueno G, Ohara R, Martins MG, Horta-Junior JAC, et al. Hypothermic Effect of Acute Citral Treatment during LPS-induced Systemic Inflammation in Obese Mice: Reduction of Serum TNF-alpha and Leptin Levels. *Biomolecules*. 2020;10(10).
16. Ohara R, Dario FL, Emilio-Silva MT, Assuncao R, Rodrigues VP, Bueno G, et al. Citral Modulates MMP-2 and MMP-9 Activities on Healing of Gastric Ulcers Associated with High-Fat Diet-Induced Obesity. *Int J Mol Sci*. 2023;24(5).
17. Bell CJ, Gall DG, Wallace JL. Disruption of colonic electrolyte transport in experimental colitis. *Am J Physiol*. 1995;268(4 Pt 1):G622-30.
18. Hubatsch I, Ragnarsson EG, Artursson P. Determination of drug permeability and prediction of drug absorption in Caco-2 monolayers. *Nat Protoc*. 2007;2(9):2111-9.
19. Ryu B, Son MY, Jung KB, Kim U, Kim J, Kwon O, et al. Next-Generation Intestinal Toxicity Model of Human Embryonic Stem Cell-Derived Enterocyte-Like Cells. *Front Vet Sci*. 2021;8:587659.
20. Emilio-Silva MT, Rodrigues VP, Fioravanti MM, Ruiz-Malagon AJ, Naia Fioretto M, Raimundo PR, et al. Citral protects against metabolic endotoxemia, and systemic disorders caused by high-fat diet-induced obesity via intestinal modulation. *Front Pharmacol*. 2025;16:1567217.

21. Petretto GL, Vacca G, Addis R, Pintore G, Nieddu M, Piras F, et al. Waste Citrus limon Leaves as Source of Essential Oil Rich in Limonene and Citral: Chemical Characterization, Antimicrobial and Antioxidant Properties, and Effects on Cancer Cell Viability. *Antioxidants* (Basel). 2023;12(6).
22. Morris GP, Beck PL, Herridge MS, Depew WT, Szewczuk MR, Wallace JL. Hapten-induced model of chronic inflammation and ulceration in the rat colon. *Gastroenterology*. 1989;96(3):795-803.
23. Katsandegwaza B, Horsnell W, Smith K. Inflammatory Bowel Disease: A Review of Pre-Clinical Murine Models of Human Disease. *Int J Mol Sci*. 2022;23(16).
24. Gotardo EM, Ribeiro Gde A, Clemente TR, Moscato CH, Tome RB, Rocha T, et al. Hepcidin expression in colon during trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis in rats. *World J Gastroenterol*. 2014;20(15):4345-52.
25. Li C, Liu M, Deng L, Luo D, Ma R, Lu Q. Oxyberberine ameliorates TNBS-induced colitis in rats through suppressing inflammation and oxidative stress via Keap1/Nrf2/NF-kappaB signaling pathways. *Phytomedicine*. 2023;116:154899.
26. Araruna MEC, Alves Junior EB, de Lima Serafim CA, Pessoa MMB, de Souza Pessoa ML, Alves VP, et al. (-)-Fenchone Ameliorates TNBS-Induced Colitis in Rats via Antioxidant, Immunomodulatory, and Cytoprotective Mechanisms. *Pharmaceuticals* (Basel). 2024;18(1).
27. Bilsborough J, Fiorino MF, Henkle BW. Select animal models of colitis and their value in predicting clinical efficacy of biological therapies in ulcerative colitis. *Expert Opin Drug Discov*. 2021;16(5):567-77.
28. Danne C, Skerniskyte J, Marteyn B, Sokol H. Neutrophils: from IBD to the gut microbiota. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2024;21(3):184-97.
29. Saez A, Herrero-Fernandez B, Gomez-Bris R, Sanchez-Martinez H, Gonzalez-Granado JM. Pathophysiology of Inflammatory Bowel Disease: Innate Immune System. *Int J Mol Sci*. 2023;24(2).
30. Oliveira HBM, das Neves Selis N, Brito TLS, Sampaio BA, de Souza Bittencourt R, Oliveira CNT, et al. Citral modulates human monocyte responses to *Staphylococcus aureus* infection. *Sci Rep*. 2021;11(1):22029.

31. Panyod S, Wu WK, Peng SY, Tseng YJ, Hsieh YC, Chen RA, et al. Ginger essential oil and citral ameliorates atherosclerosis in ApoE(-/-) mice by modulating trimethylamine-N-oxide and gut microbiota. *NPJ Sci Food*. 2023;7(1):19.
32. Sahoo DK, Heilmann RM, Paital B, Patel A, Yadav VK, Wong D, et al. Oxidative stress, hormones, and effects of natural antioxidants on intestinal inflammation in inflammatory bowel disease. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2023;14:1217165.
33. Jomova K, Alomar SY, Alwasel SH, Nepovimova E, Kuca K, Valko M. Several lines of antioxidant defense against oxidative stress: antioxidant enzymes, nanomaterials with multiple enzyme-mimicking activities, and low-molecular-weight antioxidants. *Arch Toxicol*. 2024;98(5):1323-67.
34. Tian T, Wang Z, Zhang J. Pathomechanisms of Oxidative Stress in Inflammatory Bowel Disease and Potential Antioxidant Therapies. *Oxid Med Cell Longev*. 2017;2017:4535194.
35. Kgang IE, Klein A, Mohamed GG, Mathabe PMK, Belay ZA, Caleb OJ. Enzymatic and proteomic exploration into the inhibitory activities of lemongrass and lemon essential oils against *Botrytis cinerea* (causative pathogen of gray mold). *Front Microbiol*. 2022;13:1101539.
36. Kumar A, Singh PP, Kumar M, Prakash B. Nanoencapsulated plant-based antifungal formulation against the *Aspergillus flavus* and aflatoxin B(1) contamination: Unraveling the biochemical and molecular mechanism of action. *Int J Food Microbiol*. 2022;372:109681.
37. Derkacz A, Olczyk P, Olczyk K, Komosinska-Vassev K. The Role of Extracellular Matrix Components in Inflammatory Bowel Diseases. *J Clin Med*. 2021;10(5).
38. Wang D, Zhu D, Zhao X, Wang J, Zhuang H, Zhang Y, et al. Fibroblast-Mediated MMP2 Contribution to Nonresponse in Anti-TNFalpha Therapy for Crohn's Disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2025.
39. Lucafo M, Pugnetti L, Bramuzzo M, Curci D, Di Silvestre A, Marcuzzi A, et al. Long Non-Coding RNA GAS5 and Intestinal MMP2 and MMP9 Expression: A Translational Study in Pediatric Patients with IBD. *Int J Mol Sci*. 2019;20(21).
40. Eiro N, Barreiro-Alonso E, Fraile M, Gonzalez LO, Altadill A, Vizoso FJ. Expression of MMP-2, MMP-7, MMP-9, and TIMP-1 by Inflamed Mucosa in the Initial Diagnosis of Ulcerative Colitis as a Response Marker for Conventional Medical Treatment. *Pathobiology*. 2023;90(2):81-93.

41. Salsabila DU, Wardani RK, Hasanah NU, Tafrihani AS, Zulfin UM, Ikawati M, et al. Cytoprotective Properties of Citronella Oil (*Cymbopogon nardus* (L.) Rendl.) and Lemongrass Oil (*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf) through Attenuation of Senescent-Induced Chemotherapeutic Agent Doxorubicin on Vero and NIH-3T3 Cells. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2023;24(5):1667-75.
42. Nigjeh SE, Yeap SK, Nordin N, Kamalideghan B, Ky H, Rosli R. Citral induced apoptosis in MDA-MB-231 spheroid cells. *BMC Complement Altern Med.* 2018;18(1):56.
43. Das S, Parigi SM, Luo X, Fransson J, Kern BC, Okhovat A, et al. Liver X receptor unlinks intestinal regeneration and tumorigenesis. *Nature.* 2025;637(8048):1198-206.
44. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.* 1983;65(1-2):55-63.
45. Maria-Ferreira D, Nascimento AM, Cipriani TR, Santana-Filho AP, Watanabe PDS, Sant Ana DMG, et al. Rhamnogalacturonan, a chemically-defined polysaccharide, improves intestinal barrier function in DSS-induced colitis in mice and human Caco-2 cells. *Sci Rep.* 2018;8(1):12261.
46. da Silva EN, Horta-Junior JAC, Gargaglioni LH, Dias MB. CO(2) exposure enhances Fos expression in hypothalamic neurons in rats during the light and dark phases of the diurnal cycle. *Brain Struct Funct.* 2022;227(8):2667-79.
47. Murad H, Ahmed O, Alqurashi T, Hussien M. Olmesartan medoxomil self-microemulsifying drug delivery system reverses apoptosis and improves cell adhesion in trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis in rats. *Drug Deliv.* 2022;29(1):2017-28.
48. Krawisz JE, Sharon P, Stenson WF. Quantitative assay for acute intestinal inflammation based on myeloperoxidase activity. Assessment of inflammation in rat and hamster models. *Gastroenterology.* 1984;87(6):1344-50.
49. Beauchamp C, Fridovich I. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Anal Biochem.* 1971;44(1):276-87.
50. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry.* 1976;72:248-54.
51. Johansson LH, Borg LA. A spectrophotometric method for determination of catalase activity in small tissue samples. *Anal Biochem.* 1988;174(1):331-6.

52. Faure P, Lafond J-L. Measurement of plasma sulfhydryl and carbonyl groups as a possible indicator of protein oxidation. In: Favier AE, Cadet J, Kalyanaraman B, Fontecave M, Pierre JL, editors. Analysis of Free Radicals in Biological Systems. Basel: Birkhäuser Basel; 1995. p. 237-48.
53. Wilson MJ, Garcia B, Woodson M, Sinha AA. Metalloproteinase activities expressed during development and maturation of the rat prostatic complex and seminal vesicles. Biol Reprod. 1992;47(5):683-91.