

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Júlio de Mesquita Filho”

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

JULIANA SARAIVA ZANELATO ANDRADE

Prof. Luiz Claudio Di Stasi (Orientador)

**AVALIAÇÃO DO EFEITO SINÉRGICO DA 4-
METILESCULETINA E DA PIPERINA NA INFLAMAÇÃO
INTESTINAL INDUZIDA POR DSS EM CAMUNDONGOS**

Trabalho de Conclusão de Curso,
apresentado a Universidade
Estadual Paulista, como parte das
exigências para a obtenção do título
de Bacharel, do curso de
Graduação em Ciências
Biomédicas.

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Andrade, Juliana Saraiva Zanelato.

Avaliação do efeito sinérgico da 4-metilesculetina e da piperina na inflamação intestinal induzida por DSS em camundongos / Juliana Saraiva Zanelato Andrade. - Botucatu, 2024

Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Ciências Biomédicas) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Biociências, Botucatu

Orientador: Luiz Claudio Di Stasi

Capes: 21001006

1. Doenças inflamatórias intestinais. 2. Escopoletina. 3. Alcalóides. 4. Cumarínicos.

Palavras-chave: 4ME; DII; PIP; alcalóides; cumarinas.


JULIANA SARAIVA ZANELATO ANDRADE

AVALIAÇÃO DO EFEITO SINÉRGICO DA 4-METILESCULETINA E DA PIPERINA NO MODELO DE INFLAMAÇÃO INTESTINAL INDUZIDO POR DSS EM CAMUNDONGOS

Trabalho de Conclusão de Curso, apresentado a Universidade Estadual Paulista, como parte das exigências para a obtenção do título de Bacharel, do curso de Graduação em Ciências Biomédicas.


Botucatu, 03 de dezembro de 2024.

BANCA EXAMINADORA

Documento assinado digitalmente
 LUIZ CLAUDIO DI STASI
Data: 10/12/2024 14:13:53-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>


Prof. Luiz Claudio Di Stasi (Orientador)

Universidade Estadual Paulista (UNESP). Campus de Botucatu. Instituto de Biociências (IBB)

Documento assinado digitalmente
 MARCIA GUIMARAES DA SILVA
Data: 04/12/2024 14:35:22-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Marcia Guimarães da Silva

Universidade Estadual Paulista (UNESP). Campus de Botucatu. Faculdade de Medicina (FMB)

Documento assinado digitalmente
 LUCIANE ALARCAO DIAS MELICIO
Data: 04/12/2024 14:47:46-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Luciane Alarcão Dias Melicio

Universidade Estadual Paulista (UNESP). Campus de Botucatu. Faculdade de Medicina (FMB)

"Nunca tenha medo do espaço entre seus sonhos e a realidade.

Se você pode sonhá-lo, pode realizá-lo."

Mae Jaminson.

"Liberdade é pouco.

O que eu desejo ainda não tem nome."

Clarice Lispector.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de expressar minha mais sincera gratidão ao meu orientador, Luiz Claudio Di Stasi, por sua orientação constante, paciência e incentivo ao longo deste projeto. Sua dedicação como professor, orientador e pesquisador foram fundamentais para o desenvolvimento desta pesquisa e para a minha formação como biomédica e como pesquisadora.

Não poderia deixar de agradecer a FAPESP, pelo financiamento, e às pessoas do Laboratório FitoFarmaTec, que sempre estiveram dispostas a ajudar, esclarecer todas as dúvidas, trocar conhecimentos e oferecer apoio nos momentos mais desafiadores. A convivência do dia a dia e o aprendizado compartilhado com vocês foram essenciais. Em especial, gostaria de agradecer a Bruna de Assis Vidal e a Gabriela da Costa Ribeiro, pela parceria imensurável nos últimos dois anos, sem vocês essa jornada teria sido muito mais desafiadora.

Agradeço imensamente minha família, que sempre esteve ao meu lado durante toda essa caminhada, vocês foram essenciais. Dedico esse trabalho ao meu pai, Afonso Martins Andrade e minha mãe, Rosângela Ap. Zanelato Andrade, cada oportunidade que vocês me deram ao decorrer destes 24 anos me trouxe onde estou hoje, agradeço por confiarem e mim e serem eternamente a minha base.

Agradeço a Universidade Estadual Paulista, a ETEC Guaracy Silveira e a Escola de Aplicação da FEUSP, todas instituições que passei nestes 18 anos de aprendizado constante. Espero um dia devolver para a educação pública brasileira tudo o que me foi proporcionado. Agradeço meu professor de Biologia do ensino fundamental, Professor Caio, por ter sido o primeiro a plantar a semente da ciência em minha cabeça, hoje ela ainda cresce.

Agradeço á todos os amigos que fiz em Botucatu nestes cinco anos, foram vocês que fizeram essa jornada ser leve e ser muito mais do que apenas a graduação. Obrigada Julia Gabriela, Gabriele Couto e a Michele Leite, dividir casa com vocês neste último ano acalmou meu coração e minha cabeça, coisas necessárias para se finalizar um TCC.

Em especial, agradeço a República Manga Rosa por ter sido meu lar, mesmo a 300km de casa. Vocês me ensinaram coisas nem a faculdade nem meus pais poderiam me ensinar, levo cada momento com vocês no meu coração e sou eternamente grata por ter tido minha vida cruzada pela de vocês.

Por último, agradeço ao meu eu do passado que perseverou diante das dificuldades para conquistar o sonho gigante que mal cabia no peito. Deu certo!!!

RESUMO

A Doença Inflamatória Intestinal (DII) é uma doença crônica não transmissível, sendo dividida entre Doença de Crohn (DC) e Retocolite Ulcerativa (RCU), dependendo do quadro de inflamação do paciente. A etiologia DII não está claramente elucidada, mas envolve fatores genéticos, estilo de vida, causas ambientais, desregulação da resposta imune, entre outras. Entretanto, estudos prévios indicam que a inflamação intestinal está diretamente relacionada com o aumento do estresse oxidativo, resultado de quantidades excessivas de espécies reativas a oxigênio (ROS) e espécies reativas de nitrogênio (RNS), as quais induzem a degradação de proteínas e membranas celulares que auxiliam a propagação e avanço da doença. A 4-metilesculetina (4-ME), um derivado cumarínico com atividade antioxidante e anti-inflamatória intestinal, agindo por diferentes mecanismos antioxidantes, especialmente sequestrando espécies reativas de oxigênio, modulando o estresse oxidativo através da diminuição da depleção da glutatona e redução da mieloperoxidase. A piperina (PIP) é um alcaloide piperínico que atua como agente anti-inflamatório intestinal através da ativação de receptores pregnano X e na modulação do fator de transcrição NF- κ B e receptores tipo Toll (TLR4). Os dados descritos previamente em diferentes modelos experimentais sinalizam que esses compostos agem por diferentes mecanismos, indicando a possibilidade de que, quando administrados em associação, seus efeitos podem ser potencializados via ação sinérgica, gerando um produto com potenciais aplicações na prevenção e controle o avanço da DII. Os efeitos anti-inflamatórios e antioxidantes intestinais da 4-metilesculetina e da piperina foram confirmados através da redução da quantificação da MPO, que representa a redução do estresse oxidativo, e a diminuição do escore do IAD, que sinaliza a redução dos sintomas clínicos da doença., quando comparado com o grupo controle. O grupo que associava ambos os compostos não apresentaram um caráter sinérgico, pois sua associação não potencializou os efeitos apresentados isolados. Conclui-se assim que, tanto a 4-ME quanto a PIP, tem potencial farmacológicos para um tratamento complementar para a DII, com o foco na redução da inflamação e das espécies reativas de oxigênio.

Palavras-chave: *cumarinas, 4ME, PIP, alcalóides, DII.*

ABSTRACT

Inflammatory Bowel Disease (IBD) is a chronic non-communicable disease, divided into Crohn's Disease (CD) and Ulcerative Colitis (UC), depending on the patient's inflammatory condition. The etiology of IBD is not clearly elucidated, but involves genetic factors, lifestyle, environmental causes, dysregulation of the immune response, among others. However, previous studies indicate that intestinal inflammation is directly related to increased oxidative stress, resulting from excessive amounts of reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS), which induce the degradation of proteins and cell membranes that aid the propagation and progression of the disease. 4-methylscutletin (4-ME), a coumarin derivative with antioxidant and intestinal anti-inflammatory activity, acts through different antioxidant mechanisms, especially by scavenging reactive oxygen species, modulating oxidative stress by decreasing glutathione depletion and reducing myeloperoxidase. Piperine (PIP) is a piperine alkaloid that acts as an intestinal anti-inflammatory agent by activating pregnane X receptors and modulating the transcription factor NF- κ B and Toll-like receptors (TLR4). Previously described data in different experimental models indicate that these compounds act through different mechanisms, indicating the possibility that, when administered in combination, their effects may be potentiated via synergistic action, generating a product with potential applications in the prevention and control of IBD progression. The intestinal anti-inflammatory and antioxidant effects of 4-methylscutletin and piperine were confirmed by the reduction in MPO quantification, which represents the reduction in oxidative stress, and the decrease in the DAI score, which indicates the reduction in clinical symptoms of the disease, when compared to the control group. The group that associated both compounds did not present a synergistic character, since their association did not potentiate the effects presented alone. It is therefore concluded that both 4-ME and PIP have pharmacological potential for complementary treatment of IBD, with a focus on reducing inflammation and reactive oxygen species.

Keywords: *coumarin, 4ME, PIP, alkaloids, IBD.*

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	9
<i>Doença Inflamatória Intestinal</i>	9
<i>Microbiota intestinal</i>	11
<i>Justificativas dos produtos testes</i>	12
OBJETIVOS	14
METODOLOGIA	15
<i>Drogas e animais de experimentação</i>	15
<i>Avaliação da atividade anti-inflamatória intestinal</i>	15
<i>Avaliação da clínica dos animais e macroscópicas da lesão</i>	15
<i>Análises bioquímicas</i>	16
<i>Quantificação de Ácidos Graxos de Cadeia Curta</i>	16
<i>Análises Estatísticas</i>	16
RESULTADOS	17
DISCUSSÃO	23
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	27

INTRODUÇÃO

Doença Inflamatória Intestinal

A Doença Inflamatória Intestinal (DII) é uma doença crônica não transmissível (DCNTs) categorizada em Retocolite Ulcerativa (RCU) e Doença de Crohn (DC) de acordo com as características fisiopatológicas e localização da lesão. A DC e RCU se caracterizam como uma inflamação crônica do intestino, com períodos de exacerbação seguidos de intervalos prolongados de remissão de sintomas, sendo também marcada pela ulceração e infiltração de neutrófilos da mucosa, desconforto e dor abdominal com alterações do hábito intestinal, mas com diferenças quanto às características do processo inflamatório (Ghosh e cols., 2014; Di Stasi e cols., 2015; Di Stasi, 2021). Enquanto na DC há um quadro transmural de inflamação, afetando todo o órgão de forma não contínua, na RCU ocorre um quadro de alterações profundas na mucosa, como abscessos, fístulas e ulcerações, entretanto restrita na área do cólon. (Zhang e cols, 2014). Nestas doenças, os fatores ambientais associados à predisposição genética induzem uma resposta imune exacerbada, assim como redução da barreira intestinal associada ao estresse oxidativo e disbiose (Ananthakrishnan, 2015; Ananthakrishnan e cols., 2018).

A DII é uma doença crônica que aumenta globalmente, afetando de 6 a 8 milhões de pessoas e apresentando uma taxa média de prevalência e 84.7 pessoas /100.000 habitantes, sendo a América do Norte (422/100.000 habitantes) o país com maior prevalência (GDB, 2017). Embora apresente uma taxa de mortalidade de 0.51/100.000 indivíduos, a DII está crescendo exponencialmente, com altas prevalências em países industrializados e baixas prevalências em países em desenvolvimento (GDB, 2017). O Brasil, segundo a Sociedade Brasileira de Coloproctologia (SBCP), é considerado um país com um grande índice de prevalência, em 2022 houve relato de 100 casos a cada 100 mil habitantes no sistema único de saúde (SUS), tendo suas maiores concentrações no Sul e Sudeste (Brasília, 2022). Portadores de RCU e DC vivem diariamente com vários efeitos prejudiciais às suas atividades físicas, sociais e profissionais, visto que estas doenças produzem efeitos limitantes tais como alterações nos hábitos intestinal com sequentes evacuações, dor abdominal, diarreia, sangramentos, fístulas perianais e outras manifestações extraintestinais (Ghosh e cols., 2014).

Os tratamentos atuais envolvem o controle de sintomas e uma tentativa de impedir o avanço da doença, sendo utilizado uma série de classes farmacológicas, tais como os aminossalicilatos, glicocorticóides, imunossupressores e terapia biológica baseada em anticorpos monoclonais, os quais além de não representar a cura definitiva, causam uma série

de efeitos colaterais, especialmente por serem usadas por longos períodos (Di Stasi e cols., 2015; Di Stasi, 2023). Em adição, a DII por ser de caráter multifatorial e com inúmeros fatores ambientais envolvidos em sua etiologia e patogenicidade, a frequência de pacientes refratários à estas drogas é alta, indicando a necessidade de desenvolvimento de outras estratégias terapêuticas (Ananthkrishan e cols., 2018; Ananthkrishan e cols., 2015).

Apesar da DII ser objeto de pesquisa há várias décadas, sua etiologia ainda é desconhecida e um único agente ou mecanismo isolado não parece ser suficiente para produzir ou desencadear a doença. A etiologia da DII é complexa, envolvendo a interação de fatores genéticos e ambientais, os quais estão diretamente relacionados tanto à sua ocorrência como ao seu desenvolvimento. Estes fatores em conjunto com a microbiota intestinal promovem um mecanismo que ativa células de origem imune e não-imune que compõem o sistema de defesa da mucosa intestinal, sendo assim uma doença de origem multifatorial (Souza e Fiocchi, 2016; Ananthkrishan e cols., 2018; Ananthkrishan e cols., 2015). Por meio de uma resposta imune exagerada e inapropriada da mucosa à microbiota intestinal normal, a qual é facilitada por alterações na barreira epitelial intestinal e mediada principalmente por células T, se desencadeia uma intensa síntese e liberação de diferentes mediadores pró-inflamatórios, incluindo espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, eicosanóides, fator de agregação plaquetária e inúmeras citocinas pró-inflamatórias como o TNF- α , IL-1 β e IL-12 (Souza e Fiocchi, 2016; Di Stasi, 2021). Há evidências que fatores genéticos tornem o indivíduo suscetível ao desenvolvimento da doença e que os fatores ambientais seriam responsáveis por seu desencadeamento e sua modulação, dentre os quais se destacam a dieta, condições de higiene e sanitárias e em especial a composição da microbiota intestinal (Souza e Fiocchi, 2016; Ananthkrishan e cols., 2018; Ananthkrishan e cols., 2015).

Inúmeros fatores ambientais, tais como a perda de sono, deficiência de vitamina D, inatividade física, alto consumo energético, estresse psicológico, radiação ultravioleta, consumo de álcool, cafeína e tabaco induzem um estresse oxidativo crônico com consequente dano celular sustentado e inflamação, os quais contribuem com o desenvolvimento e a manutenção da DII (Seyedsadjadi e cols., 2020; Ananthkrishan e cols., 2015; Di Stasi, 2023). Além destes fatores extrínsecos, a microbiota intestinal desempenha papel fundamental na patogênese da DII quando afetada de forma negativa, promovendo um processo denominado de disbiose, diretamente imbricada com o estresse oxidativo (Di Stasi, 2023; Ghosh e cols., 2014; Ghouri e cols., 2020; Tian e cols., 2017; Krystek-Korpacka e cols., 2020).

O estresse oxidativo é representado essencialmente pelo desequilíbrio entre espécies reativas de oxigênio (radicais de hidroxila, peroxila, alcoxila e hidroperoxila ácido hipocloroso, peróxido de hidrogênio e hidroperóxidos) e nitrogênio (óxido nítrico, nitrodioxido, peroxinitrila e outros) com o sistema antioxidante endógeno, que envolve produtos como o sistema glutatona (glutationa reduzida, glutatona S-transferase, glutatona redutase entre outros), catalase, heme-oxigenase 1, superóxido dismutase e sistema tioredoxina entre outros (Di Stasi, 2023). O sistema antioxidante endógeno é coordenado principalmente pelo fator de transcrição *nrf-2* (*nuclear fator erythroid 2-related fator 2*) e suas integrações com os fatores de transcrição *NF-κB* (*nuclear factor kappa B*) e *PPAR-γ* (*peroxisome proliferator-activated receptor gamma*), promovendo proteção antioxidante celular, vesicular e molecular, reduzindo a ação prejudicial de espécies reativas na função de barreira, na estrutura de proteínas, lipídeos e DNA e, na produção de citocinas pró-inflamatórias (Di Stasi, 2023; Seyedsadjadi e cols., 2020). Este desequilíbrio entre agentes oxidantes e o sistema antioxidante endógeno é a base da persistência do dano celular e um dos fatores de origem, desencadeamento e desenvolvimento de várias DCNTs, incluindo a DII, obesidade, diabetes, doenças cardiovasculares e respiratórias, síndrome metabólica e doenças neurodegenerativas, entre outras (Di Stasi, 2021; Di Stasi, 2023; Ghouri e cols., 2020; Tian e cols., 2017; Krystek-Korpacka e cols., 2020; Bourgonje e cols., 2020; Crisostomo e cols., 2022).

Microbiota intestinal

A disbiose é caracterizada pelas alterações da diversidade, quantidade e razão de composição entre micro-organismos benéficos e prejudiciais que compõem a microbiota intestinal em contraposição à homeostasia estabelecida pelo processo simbiótico entre estes micro-organismos e o hospedeiro (Ananthkrishnan e cols., 2015). A microbiota intestinal consiste em uma variedade de micro-organismos, especialmente bactérias que habitam o trato gastrointestinal, as quais vivem simbioticamente com o hospedeiro e desempenham papel fundamental na manutenção da integridade de barreira intestinal, na função, metabolismo e imunidade do intestino, na regulação parcial dos eixos intestino-cérebro e intestino-pele, entre outros sistemas de interação (Polak e cols., 2021; Agusti e cols., 2018; Carabotti e cols., 2015; Dalile e cols., 2019; O'Neill e cols., 2016).

Novas abordagens terapêuticas e a elaboração de tratamentos complementares multialvo são de grande importância e têm sido estimuladas tendo em vista a prevenção, controle e o aumento do tempo de remissão de sintomas com consequente redução dos índices de

prevalência e melhora na qualidade de vida dos pacientes (Di Stasi, 2023; Ghosh e cols., 2014). Considerando-se ainda o caráter etiológico multifatorial da DII, o uso de produtos que atuem sobre mais de um dos fatores etiológicos e com mecanismos de ação anti-inflamatória distintos, especialmente modulando o estresse oxidativo, a resposta imune e o processo de disbiose se apresenta como uma abordagem promissora para o desenvolvimento de estratégias complementares de prevenção e aumento da remissão dos sintomas da DII. Neste sentido, o presente projeto visa avaliar os efeitos da administração isolada e associada da 4-metilesculetina e da piperina, dois compostos anti-inflamatórios intestinais eficazes em diferentes modelos de inflamação intestinal e que atuam por diferentes mecanismos de ação e vias de sinalização, conforme abaixo descrito.

Justificativas dos produtos testes

Os derivados cumarínicos sintéticos e de origem natural têm sido amplamente estudados pelo grupo de pesquisa proponente deste projeto. Com o apoio da FAPESP, um estudo de relação estrutura-atividade foi realizado com 14 derivados cumarínicos, dentre os quais se destacaram por sua potência a esculetina, a dafnetina e a 4-metilesculetina (Witaicenis e cols., 2010; Witaicenis e cols., 2012; Witaicenis e cols., 2014) A 4-metilesculetina (Figura 1) é um derivado cumarínico que apresentou uma potência 10 vezes superior àquela promovida pela administração de sulfasalazina no modelo experimental de inflamação intestinal induzida por ácido trinitrobenzenosulfônico (TNBS) em ratos (Witaicenis e cols., 2012) sendo também ativa no modelo de inflamação intestinal induzida por sulfato sódico de dextrana (DSS) em camundongos (Witaicenis e cols., 2018). Estudos realizados pelo grupo de pesquisa também demonstraram que a 4-metilesculetina apresenta atividade anti-inflamatória intestinal por diferentes mecanismos, especialmente agindo como potente modulador do estresse oxidativo via o controle do desequilíbrio entre a mieloperoxidase (marcador de estresse oxidativo) e a glutaciona (principal antioxidante endógeno), regulando a expressão da glutaciona S-transferase com consequente inativação de eletrófilos e aumentando a expressão e a atividade da glutaciona redutase (enzima responsável pela produção de glutaciona), a disponibilidade de glutaciona e a expressão de Nrf2, principal fator de transcrição de marcadores antioxidantes endógenos (Tanimoto e cols., 2020). O grupo de pesquisa demonstrou ainda que estes efeitos foram relacionados à capacidade da 4-metilesculetina interagir a nível molecular com a enzima glutaciona redutase, estabilizando sua atividade enzimática e aumentando a produção de glutaciona, como descrito por estudos de docking, análises computacionais e espectroscópicas

(Tanimoto e cols., 2020). Além de atuar modulando o estresse oxidativo, a 4-metilesculetina também é capaz de reduzir os níveis de citocinas pró-inflamatórias, tais como IL-6 no modelo de inflamação intestinal induzida por DSS (Witaicenis e cols., 2018) e de IL-1 β e TNF- α no modelo de TNBS (Witaicenis e cols., 2012), sendo considerado como um importante derivado cumarínico útil como protótipo para o desenvolvimento de novas agentes anti-inflamatórios intestinais com ação moduladora do Nrf2 (Di Stasi, 2023). É importante salientar que além do seu carácter antioxidante, a sinalização de Nrf2 está associada com a inibição da via do NF- κ B, logo, visto que uma regulação positiva do Nrf2 resulta na diminuição tanto do estresse oxidativo como da produção de citocinas pró-inflamatórias reguladas pelo NF- κ B (Witaicenis e cols., 2014; Di Stasi, 2021; Di Stasi, 2023).

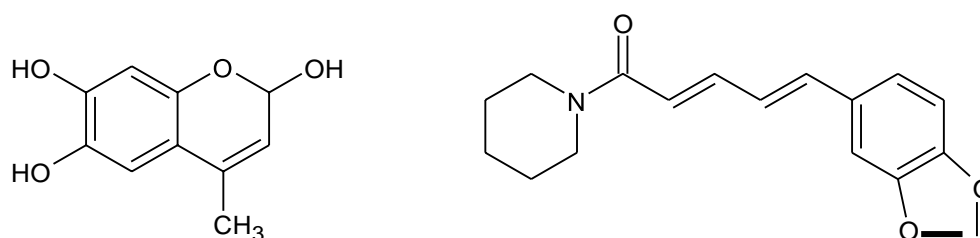


Figura 1 - Estruturas químicas da 4-metilesculetina (derivado cumarínico) e piperina (alcalóide piperínico).

A piperina (Figura 1) é um alcalóide piperínico obtido dos frutos de *Piper nigrum L.* (pimenta-do-reino) e de outras espécies da família *Piperaceae* amplamente utilizadas em culinária e como fonte de compostos anti-inflamatórios e antioxidantes, (Gupta e cols., 2015). A piperina reduziu a inflamação induzida por ácidos graxos livres mediada por receptores TLR4 (*tool-like 4*) assim como apresentou atividade anti-inflamatória intestinal, inibindo a secreção de marcadores pró-inflamatórios, tais como óxido nítrico e a citocina TNF- α (Gupta e cols., 2015). No modelo de inflamação intestinal induzida por DSS, a piperina reduziu diferentes mediadores da resposta inflamatória tais como IL-1 β , IL-6, óxido nítrico sintase, TNF- α e moléculas de adesão, agindo como um agonista de receptores pregnano X, o qual está envolvido na metabolização de fármacos (Hu e cols., 2015). Recentemente, a piperina atuando como agente inibidor da via de sinalização do NF- κ B e indutor da produção de proteínas de junção, tais como claudina-1, ocludina e *zona occludens-1*, apresentou atividade anti-inflamatória intestinal no modelo de TNBS em ratos via aumento a função de barreira intestinal (Guo e cols., 2020). Estes efeitos foram associados a uma redução significativa do estresse induzido por espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, assim como pela redução da expressão de TNF- α , IL-1 β , IL-6, INF- γ e ciclo-oxigenase 2 (Guo e cols., 2020). Diferente da 4-metilesculetina, a

pimenta-do-reino, assim como a piperina, atua como um agente prebiótico responsável pela modulação da microbiota intestinal em diferentes situações experimentais. Extrato aquoso de *Piper nigrum* aumentou o crescimento de *Bifidobacterium* spp., *Lactobacillus* spp. e *Firmicutes* spp., assim como exibiram efeito inibitório sobre populações de *Ruminococcus* e outros bacteroides, efeitos associados à presença de piperina no extrato (Lu e cols., 2017; Kondapalli e cols., 2022). Um suplemento alimentar contendo piperina induziu a redução de diferentes espécies de *Campilobacter* com tendência à redução de diferentes espécies de *Escherichia* e *Shigella*, produzindo vários benefícios sobre a fisiologia do intestino em porcos (Silva Júnior e cols., 2020). Piperina purificada também foi descrita como um inibidor do crescimento *in vitro* de *Clostridium* (Lakes e cols., 2020).

Estudos recentes demonstram que a piperina potencializa a ação de outros produtos. Quando co-administrada com a curcumina, a piperina aumenta a biodisponibilidade da curcumina, potencializando seus efeitos antioxidante, hipoglicemiante e anti-inflamatório, assim como reduzindo o estresse oxidativo em doenças crônicas neurodegenerativas e doenças respiratórias (Heidari e cols., 2023; Hewlings e Kalman, 2017). A administração de piperina também aumentou a atividade anti-inflamatória intestinal da curcumina no modelo de inflamação intestinal induzida por DSS em camundongos, por facilitar a absorção e a biodisponibilidade da curcumina (Li e cols., 2015). Efeitos similares foram demonstrados quando a piperina também aumentou a biodisponibilidade do extrato de raízes de *Amaranthus roxburghianus*, melhorando sua atividade anti-inflamatória intestinal no modelo de inflamação intestinal induzida por ácido acético em camundongos (Nirmal e cols., 2013).

Estes dados sugerem que a piperina, além de apresentar atividade anti-inflamatória intestinal, antioxidante e moduladora da microbiota intestinal, é um alcalóide que pode aumentar a disponibilidade de outros constituintes químicos, indicando um potencial efeito sinérgico com a 4-metilesculetina quando administrados em associação.

OBJETIVOS

Com base nestas informações, o presente estudo teve como objetivos:

- 1 - Avaliar se a 4-metilesculetina e a piperina administradas isoladamente modulam o estresse oxidativo e a microbiota intestinal dos animais no modelo de inflamação intestinal induzida por DSS em camundongos;
- 2 - Avaliar se a administração conjunta de 4-metilesculetina e a piperina potencializa a atividade antioxidante e moduladora da microbiota intestinal no modelo de inflamação intestinal induzida por DSS em camundongos;

METODOLOGIA

Drogas e animais de experimentação

Foi utilizado a cumarina 4-metilesculetina (Sigma-Aldrich) e piperina (Sigma-Aldrich), com grau de pureza 100%. Os experimentos foram realizados em camundongos machos C57BL/6 provenientes da AniLab (Animais de Laboratório), Paulínia, SP.

Avaliação da atividade anti-inflamatória intestinal

Camundongos C57BL/6 (25-35g) foram alojados em condições ambientais controladas de temperatura e umidade ($21 \pm 2^\circ\text{C}$, 60-70% de umidade) com ciclo de claro / escuro controlado de 12h e filtração de ar. Os animais tiveram livre acesso a água e alimento (Nuvilab) até o início do protocolo experimental. Os protocolos experimentais foram conduzidos de acordo com as “Diretrizes de Experimentação Animal” e aprovadas pela Comissão de Ética em Experimentação Animal, Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista, UNESP (Comitê de Ética Protocolo 4825070623).

Os experimentos realizados tiveram de acordo com metodologia descrita por Camuesco e cols., 2005 com algumas modificações, incluindo um grupo branco (animais saudáveis) e um grupo controle (animais com processo inflamatório intestinal). O processo inflamatório intestinal foi induzido por adição de DSS 3% (PM 36-50Kd) durante 7 dias na água de beber fornecida aos animais. Os grupos tratados receberam 6 doses por via oral através da técnica de gavagem nas seguintes doses: 5mg/Kg de 4-metilesculetina (Tratado 1), 25 mg/Kg piperina (Tratado 2) e 5mg/Kg de 4-metilesculetina + 25 mg/Kg piperina (Tratado 3). Após este período, os animais foram mortos para obtenção das amostras de material biológico (sangue e cólon) a serem estudadas. O cólon foi dividido longitudinalmente em tiras para serem usados nas análises bioquímicas. No dia zero e no dia sete do experimento ocorreu a coleta das fezes das caixas dos animais para ser realizada análises de ácidos graxos de cadeia curta AGCC para a quantificação.

Avaliação da clínica dos animais e macroscópicas da lesão

Durante o desenvolvimento dos experimentos, os animais foram avaliados diariamente quanto ao consumo de alimento, peso corporal, aparecimento de fezes diarreicas e presença de sangramento retal, parâmetros utilizados para elaboração do Índice de Atividade da Doença (IAD) (Camuesco e cols., 2006). Após a morte dos animais os cólons foram retirados e

analisados quanto aos prejuízos intestinais através das análises bioquímicas, peso e comprimento do cólon e relação peso/comprimento cólico. Adicionalmente, retiramos e pesamos o baço dos animais de todos os grupos.

Nos setes dias foram registados o consumo de ração, tal como a variação de peso dos animais e o Índice da Atividade da Doença (IAD) através da pontuação mostrada na Tabela 1, o que resultou em um escore da doença de cada animal/dia.

Perda de peso (%)	Pontuação	Consistência das fezes	Pontuação	Sangramento retal	Pontuação
<i>nenhum</i>	0	<i>normal</i>	0	<i>nenhum</i>	0
1-5%	1	<i>pastosa/solta</i>	1	<i>sangramento leve</i>	1
5-10%	2	<i>diarreia leve</i>	2	<i>sangramento intenso</i>	2
10-20%	3	<i>diarreia intensa</i>	3		
>20%	4				

O valor total é a somatória da pontuação da perda de peso, consistência das fezes e sangramento retal, variando de 0 a 9.

Tabela 1 - Escore do IAD (Índice de Atividade da Doença)

Análises bioquímicas

Em amostras de cólon dos animais de todos os grupos, foi avaliado os níveis cólicos de glutathiona (GSH) total de acordo com o previamente descrito por Anderson, 1995 como marcador endógenos antioxidante e da atividade da mieloperoxidase (MPO) de acordo com o protocolo experimental descrito por Krawisz e cols,1984. Em adicional, foi realizado a quantificação de fosfatase alcalina, enzima presente em abundância em casos de inflamação intestinal, seguindo o protocolo de Smith e cols., (1985) e Bessey e cols., (1946).

Quantificação de Ácidos Graxos de Cadeia Curta

A coleta de fezes do animais tratados com os compostos foi realizada no dia 0 e dia 7 do experimento, estas amostras foram processadas para a determinação dos ácidos graxos de cadeia curta (AGCCs) de acordo com o protocolo adaptado por Almeida-Junior e cols. (2017). As análises foram realizadas em um cromatógrafo gasoso acoplado à espectrometria de massa (GC-MS Thermo Scientific, modelo FOCUS ISQ 230ST, com injetor automático triplus DUO e biblioteca NIST 2008). Os valores obtidos da concentração de AGCCs são expressos em mg/ml que, posteriormente, foram convertidos em $\mu\text{Mol/g}$.

Análises Estatísticas

Todos os dados foram expressos com a média \pm erro padrão da média (EPM), sendo a significância estatística considerada para valores de $p \leq 0,05$. Dados não paramétricos foram analisados por Kruskal-Wallis seguido de teste de Dunn e dados paramétricos foi utilizado Análise de Variância (ANOVA) seguida de teste de Dunnut.

RESULTADOS

O projeto foi iniciado em janeiro de 2024 com a experimentação animal contendo um n inicial variado seguindo a necessidade de cada grupo, como mostrado na Tabela 2. Durante a experimentação, nenhum animal entrou em óbito em decorrência da indução da doença ou da manipulação humana. No entanto, um animal do grupo 4-ME+PIP apresentou hiper crescimento dentário associado à má oclusão bucal, doença comum em roedores que não conseguem gerar um desgaste adequado da arcada dentária e consequente crescimento contínuo dos dentes (Kutsumoto, 2023) e foi retirado do experimento.

	Nº Inicial	Nº Final
Branco	10	10
Controle	12	12
4-metilesculetina	8	8
Piperina	9	9
4-ME + Piperina	8	7*

Tabela 2 – Número final de animais utilizados em cada grupo experimental.

Na Figura 2 constam os dados de IAD (Índice de Atividade da Doença) dos diferentes grupos experimentais ao longo dos dias de experimentação. Nesta figura se observa que não houve diferença significativa entre os grupos até o dia 3 de experimentação. No dia 4 se detectou uma diferença significativa entre o grupo controle com o grupo branco, indicando a instalação do processo inflamatório intestinal, cujo pico dos sintomas ocorre no dia 5 (Figura 2). A partir do dia 5, os tratamentos reduziram significativamente o IAD de forma diferencial, sendo que 4-ME e PIP reduziram de forma significativa o IAD no dia 5 de experimentação, enquanto o grupo 4-ME+PIP apenas no dia 6 (Figura 2). É interessante notar que os efeitos de 4-ME, mas não de PIP, permanecem significativos no dia 6.

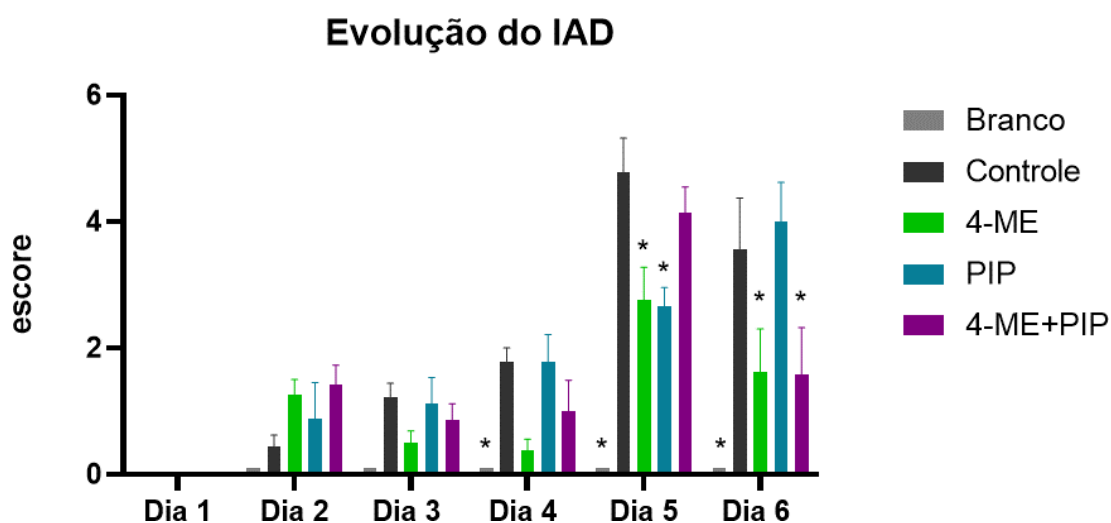


Figura 2 - Escore do IAD (Índice de Atividade da Doença) nos dias de experimentação. Dados expressos em média \pm E.P.M.

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ comparado com o Controle.

Na Figura 3 é apresentado a diferença de peso (Delta peso) da média de cada animal/grupo durante o experimento, o qual foi calculado pela diferença da massa corporal entre o último e o dia 0 de experimentação. Como mostrado abaixo, é evidente que os animais do grupo controle perderam mais peso que outros grupos, enquanto nos animais do grupo branco este parâmetro se manteve estável.

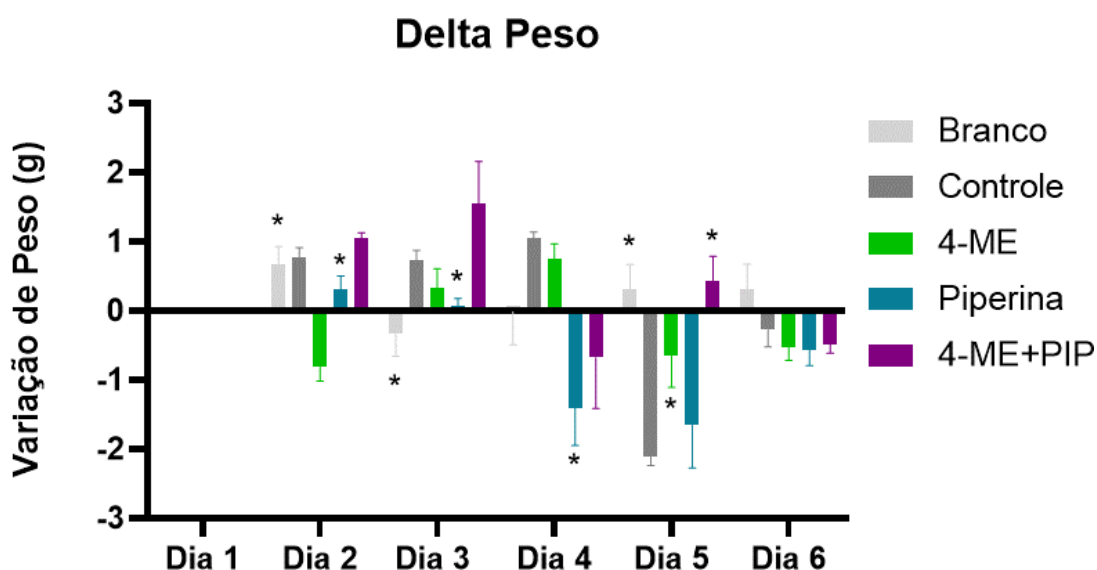


Figura 3 - Delta Peso de cada animal/grupo. Dados expressos em média \pm E.P.M. com * $p < 0,05$, comparado com o Controle.

Nos animais dos grupos tratados, ocorreu variações referente ao ganho e perda de peso. Na Tabela 3 temos a quantificação da perda percentual de peso dos animais através da porcentagem da média de variação do delta peso de cada animal/grupo. Os animais do grupo controle tiveram uma perda expressiva de peso, enquanto os animais do grupo branco foram os únicos a ganharem peso durante os sete dias de experimentação. Os grupos tratados tiveram uma perda de peso, porém amena quando comparado ao grupo controle.

	<i>Branco</i>	<i>Controle</i>	<i>4-metilesculetina</i>	<i>Piperina</i>	<i>4-ME + PIP</i>
Peso Inicial (g)	24,67 ± 1,34	25,83 ± 0,66	26,33 ± 1,11	27,18 ± 0,70	26,33 ± 0,72
Peso final (g)	24,98 ± 1,10	23,72 ± 0,66	25,81 ± 1,09	26,62 ± 0,70	25,85 ± 0,64
Δ Peso (g)	0,31 ± 0,36	-1,39 ± 0,39	-0,52 ± 0,18	-0,563 ± 0,23	-0,48 ± 0,11
Δ Peso (%)	1,25%	-5,38%	-1,99%	-2,07%	-1,83%

Tabela 3 - Percentual de perda de peso através do Delta peso. Dados expressos em média ± E.P.M.

Na Figura 4 se observa os níveis de glutatona total (GSH) nos grupos experimentais. Nesta figura os animais do grupo Branco apresentaram os níveis de glutatona elevados em relação aos animais do grupo Controle, tendo uma diferença estatística. A redução dos níveis de GSH total mostradas pelos grupos que receberam o DSS, indicam uma maior depleção da glutatona nestes grupos, o que se refere há um ambiente oxidativo e inflamatório. Nenhum tratamento (4-ME, PIP e 4-ME+PIP) conseguiu evitar a depleção da glutatona em relação ao grupo controle durante os sete dias de experimentação.

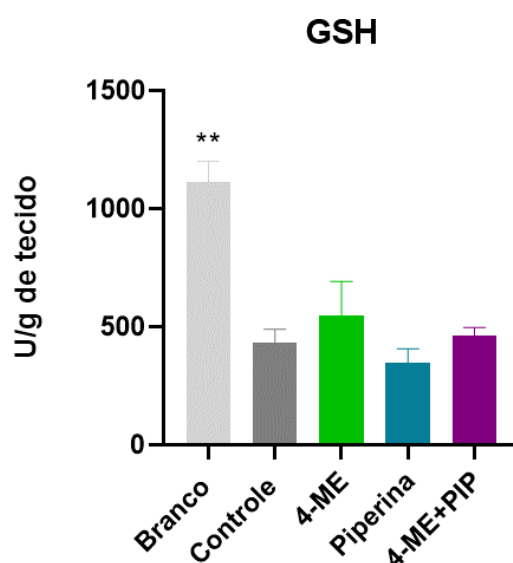


Figura 4 - Quantificação da Glutatona Total. Dados expressos em média ± E.P.M, com ** p<0,01, comparado com o Controle, em Unidade de GSH por grama de tecido.

Na Figura 5 temos a representação da atividade da mieloperoxidase nos diferentes grupos experimentais, a qual está significativamente aumentada nos animais do grupo controle quando comparada aos animais do grupo branco. Neste parâmetro, todos os tratamentos diminuiram significativamente a atividade da MPO em relação ao grupo controle, sendo que o grupo PIP apresentou um $p < 0,01$.

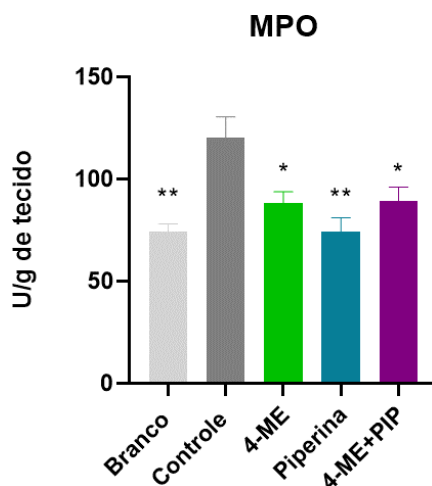


Figura 5 - Quantificação de Mieloperoxidase. Dados expressos em média \pm E.P.M, com * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$, comparado com o Controle, em Unidade de MPO por grama de tecido.

Na Figura 6 se observa os efeitos dos diferentes tratamentos sobre a atividade da fosfatase alcalina intestinal (FAI), onde não ocorreu nenhuma diferença estatística entre os grupos tratados e saudável em relação ao grupo controle.

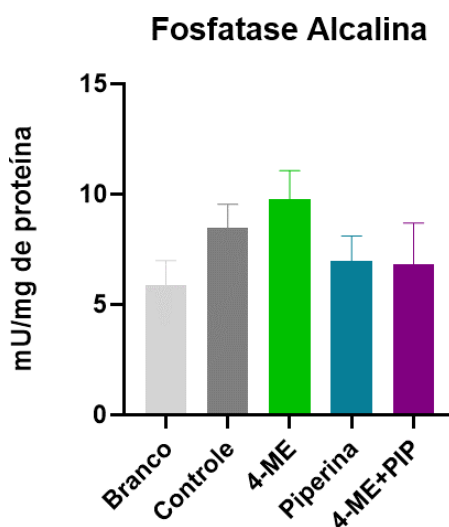


Figura 6 - Quantificação da Fosfatase Alcalina Intestinal. Dados expressos em média \pm E.P.M, em mili Unidade de FAI por mg de proteína.

Os ácidos graxos de cadeia curta (AGCCs) são os produtos de maior abundância produzidos pelas bactérias da microbiota intestinal, humana e animal. Os AGCCs de maior importância são o acetato, propionato e o butirato, sendo que juntos eles compõem mais de 98% de todos os AGCCs produzidos (Sun e cols, 2017). No Figura 7, 8 e 9 é apresentado a quantificação dos AGCCs em $\mu\text{Mol/g}$ de fezes dos camundongos, sendo elas coletadas no dia 0 (animais saudáveis) e no dia 7 do experimento. Os resultados indicam que nenhum dos tratamentos modulou a produção de acetato, propionato e butirato.

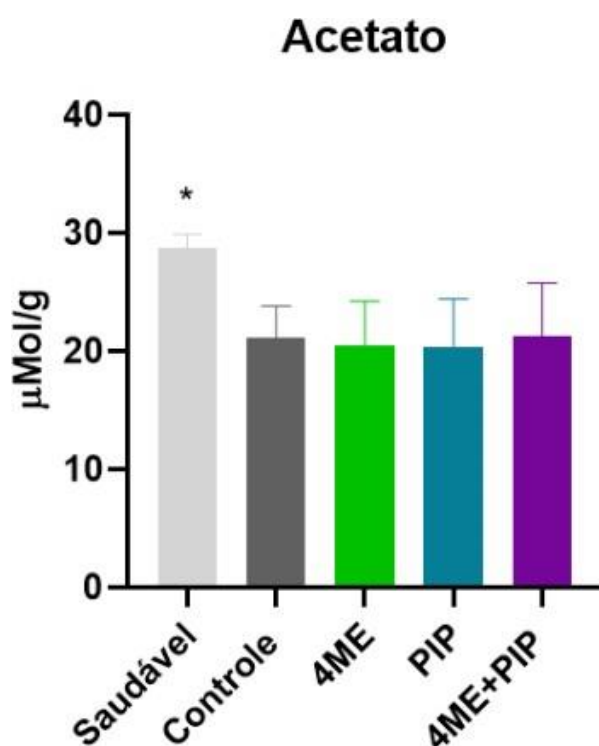


Figura 8 - Quantificação dos AGCC - Propionato em $\mu\text{Mol/g}$. Dados expressos em média \pm E.P.M, com * $p < 0,05$ comparado com o Controle.

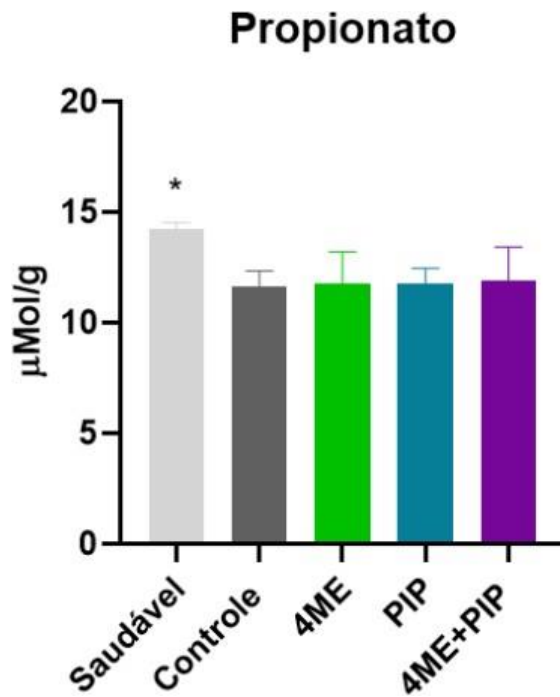


Figura 7 - Quantificação dos AGCC - Acetato em $\mu\text{Mol/g}$. Dados expressos em média \pm E.P.M, com * $p < 0,05$ comparado com o Controle.

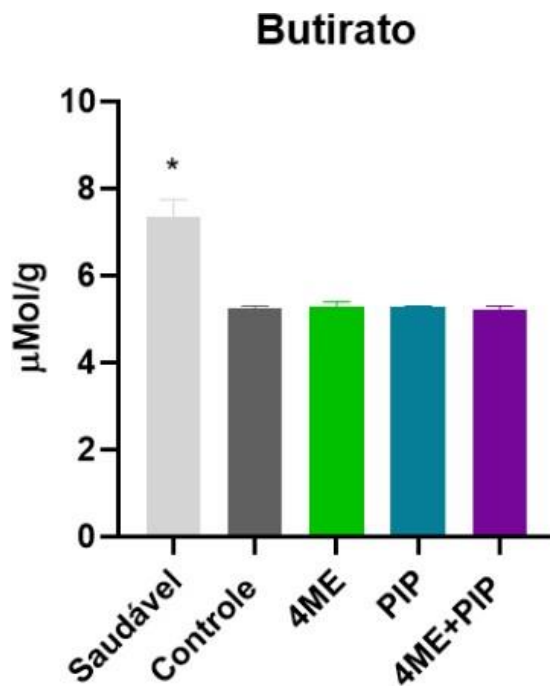


Figura 9 - Quantificação dos AGCC - Butirato em $\mu\text{Mol/g}$. Dados expressos em média \pm E.P.M, com * $p < 0,05$ comparado com o Controle.

DISCUSSÃO

O Índice de Atividade da Doença (IAD), descrito por Camuesco em 2006, é uma forma de analisar o desenvolvimento clínico da inflamação intestinal induzida por DSS, contendo variações. O índice consiste em pontuações atribuídas em relação a redução percentual de peso, consistência das fezes e aparecimento de sangramento retal. Através do escore do IAD é possível ter um parâmetro dos sintomas clínicos dos animais em experimentação, uma vez que esses dados são obtidos de cada animal separadamente. Neste sentido, os dados demonstram que 4-metilesculetina, piperina e a associação de 4-metilesculetina com piperina foram capazes de reduzir o IAD de forma diferencial, sendo que os efeitos de 4-metilesculetina foram mantidos a partir do dia 5 de experimentação. Na literatura não se tem relatos do IAD com o tratamento de 4-ME ou PIP no modelo de inflamação intestinal induzida por DSS, entretanto em dados descritos no modelo de TNBS por Witaicenis e cols., 2010, o tratamento de 4-ME na dose de 5 mg/kg apresenta diferença estatística em relação ao grupo controle em redução da perda percentual de peso, consistência das fezes e sangramento retal, os mesmos parâmetros utilizados no IAD. Gupta e cols., 2015 descrevem que a PIP na dosagem de 10 mg/kg reduziu os parâmetros clínicos da doença. No entanto, estes resultados foram observados no modelo de indução da inflamação por ácido acético. O grupo do sinergismo (4-ME+PIP) apresentou uma redução do IAD no dia final de coleta de dados, dia 6, apresentando média igual ao grupo da 4-ME isolada. Isso reforça que não foi possível observar efeito sinérgico em relação aos efeitos clínicos mensurados pelo escore do IAD, entretanto demonstra também que a 4-ME, quando associada a PIP, conseguiu manter reduzido os sintomas clínicos da doença, mesmo ocorrendo uma tendência ao aumento, uma vez que o grupo PIP isolado teve um agravamento dos sintomas no 6º dia.

A quantificação da glutathiona total é um teste bioquímico realizado para analisar a intensidade do estresse oxidativo, pois a glutathiona é o principal antioxidante endógeno do organismo. É possível utilizar a depleção do GSH como um marcador do estresse oxidativo, pois sua depleção ocorre a partir da oxidação do GSH na presença de espécies reativas a oxigênio e nitrogênio (Circu e cols., 2012). Na Figura 3 é possível observar que nenhum tratamento evitou a depleção de glutathiona observada nos animais do grupo controle. Witaicenis e cols., 2018 demonstraram que 5 mg/kg de 4-ME também não evitou a depleção de GSH no modelo de DSS 5% por 5 dias. Em um estudo sobre hepatotoxicidade e neurotoxicidade, a PIP na dosagem de 25 mg/kg foi capaz de reduzir a depleção de GSH em um tratamento de 21 dias na indução de inflamação por microcystin-LR (Abdel-Daim e cols, 2019).

A mieloperoxidase (MPO) é uma enzima caracterizada como marcador do processo inflamatório e do estresse oxidativo, uma vez que é produzida pelos neutrófilos na fase inicial da inflamação e é responsável por catalisar a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) como o ácido hipocloroso, sendo assim crucial na via bioquímica dos EROs (Davies, 2011). Os resultados apresentados na Figura 5 demonstram que o melhor tratamento para a redução da produção da MPO foi a PIP, entretanto todos os tratamentos conseguiram reduzir de maneira significativa os índices de mieloperoxidase, indicando uma ação anti-inflamatória e antioxidante para os produtos testados. Em trabalhos com indução da doença através do modelo de TNBS em ratos, a 4-ME (5 mg/kg) não foi capaz de reduzir os níveis de MPO (Witaicenis e cols, 2014; Witaicenis e cols, 2011). Entretanto, em estudo publicado por Tanimoto e cols., 2020, a 4-ME na dose de 5 mg/kg reduziu de forma significativa os índices de MPO no modelo de TNBS. Na análise da atividade da mieloperoxidase também não se observa um efeito sinérgico da associação de 4-metilesculetina com a piperina.

As fosfatases alcalinas (FA) são enzimas metabolizadoras expressas nas membranas plasmáticas celulares de diversos tecidos, estando presente em diferentes formas de vida. Em humanos, as fosfatases alcalinas estão associadas a diversos processos celulares e apresentam classes subdivididas em relação ao tecido de ocorrência, tendo a fosfate alcalina placentária, a fosfatase alcalina de células germinativas, fosfatase alcalina inespecífica de tecido e a fosfatase alcalina intestinal (Zaher e cols, 2020). A fosfatase alcalina intestinal (FAI), ou cólica, está presente principalmente no duodeno, mas pode ser encontrada em níveis mais baixos por todo trato gastrointestinal (TGI). No intestino esta enzima desempenha funções protetoras no TGI com a redução da inflamação através da modulação da microbiota intestinal (Singh e cols., 2021). Estudos relatam que decréscimos nos níveis de FAI aumentam a suscetibilidade de inflamações como a DII, onde ocorre uma redução da síntese da FAI correlacionada com aumento da permeabilidade intestinal, aumento da endotoxemia e alterações na microbiota intestinal (Singh e cols., 2021). No experimento realizado se observou uma grande variabilidade na quantificação da FAI no tecido do cólon dos camundongos, de forma que não foi possível observar diferença estatística entre nenhum grupo (saudável ou tratado) em relação ao grupo controle.

Os AGCCs são produzidos como resultado da fermentação de diferentes produtos, principalmente, fibras, via a ação de bactérias da microbiota intestinal. Os AGCCs podem ser produzidos em toda extensão do trato gastrointestinal, porém a maior parte é produzida e absorvida no cólon, onde sua principal atuação é auxiliando a resposta imune. Dentro de um

quatro de DII, a quantidade expressiva de AGCCs auxilia na redução da inflamação através da manutenção da barreira epitelial intestinal e regulação da resposta imune (Sun e cols, 2017). Como apresentado no gráfico 7 a 9, o tratamento de 4-ME, PIP e 4-ME+PIP não foi capaz de alterar a produção dos AGCCs (acetato, propionato e butirato) quando comparado com o grupo Saudável. Estudo publicado em 2019 por Vergas e cols, cita que as alterações que a inflamação causa na microbiota intestinal altera diretamente a produção dos AGCCs, principalmente por conta da perda da quantidade de diversas cepas de bactérias responsável pela produção dos ácidos. O mecanismo de produção dos AGCCs envolve diferentes fatores, como alterações na microbiota, o substrato para a fermentação (alimentação) e a presença de inflamação. A relação entre os AGCCs e a DII é inegável, porém extremamente complexa, visto que os mecanismos de produção e absorção dos AGCCs estão relacionados diretamente com a saúde do epitélio intestinal e da microbiota (Shin et al, 2023). Quando ocorre um aumento de mobilidade do bolo fecal, como em casos de diarreia, pode ocorrer uma queda na produção dos AGCCs em decorrência da redução da fermentação das fibras alimentares, além disto, a redução da integridade da barreira intestinal causada pela inflamação pode prejudicar a absorção dos ácidos (Shin et al, 2023). Estudo sobre a produção de AGCCs com ratos Wistar com inflamação intestinal induzida por DSS demonstram a redução da produção dos ácidos graxos de cadeia curta, média e longa em casos de inflamação intestinal, além de demonstrar alta variabilidade da produção dos AGCCs em situações inflamatórias (Shagaleeva et al, 2024). Esta redução na produção de acetato, propionato e butirato nos animais controle também foi detectada no presente estudo.

A doença inflamatória intestinal, por ser caracterizada como uma doença crônica não transmissível, está em uma classe de doenças que não apresenta cura. Desta forma, pacientes diagnosticados com DII tendem a passar o resto da vida necessitando de tratamento constante para controle de sintomas e controle do avanço da doença. Atualmente tem-se diferentes classes farmacológicas utilizadas no tratamento de DII, como aminossalicilatos, glicocorticóides e imunossuppressores, entretanto o uso prolongado desses medicamentos promove muitos efeitos colaterais para os pacientes, além de que, por ser uma doença de etiologia variada, muitos pacientes não respondem adequadamente ao tratamento inicial. É de extrema importância que pesquisas busquem novos tratamentos e tratamentos complementares que apresentem menos efeitos adversos para os pacientes, sendo uma alternativa viável, a procura de classes de substâncias vegetais que tenham como o foco a redução do estresse oxidativo e da inflamação

e na melhora da microbiota intestinal, uma vez que a DII está intimamente ligada com esses parâmetros

Dentro da metodologia utilizada nesse projeto, foi possível observar que tanto a 4-metilesculetina (5 mg/kg) quanto a piperina (25 mg/kg) e sua associação (5 mg/kg 4-ME + 25 mg/kg PIP) foram capazes de reduzir a atividade de mieloperoxidase (MPO), enzima marcadora do estresse oxidativo. Isto confirma a hipótese que essas substâncias têm poder antioxidante e anti-inflamatório pela redução da quantidade de EROs. Além disto, a redução dos sintomas clínicos da doença, avaliados pelo IAD, indica que pacientes com DII tenderiam a ter uma melhora do quadro clínico da doença com um tratamento complementar com essas substâncias de origem vegetal, em especial a 4-ME.

A DII é resultado e sintoma de diferentes alterações nas populações de microrganismos no nosso intestino, que está relacionado com muitas funções biológicas de homeostase, regulação da inflamação entre outros. Nosso estudo até o presente momento se limitou na avaliação das fezes dos animais que receberam os compostos, e apesar dos tratamentos utilizados não terem apresentado uma alteração na produção dos ácidos graxos de cadeia curta (AGCCs), é de extrema importância que mais estudos sejam realizados visando analisar a atividade destes e outros compostos na microbiota intestinal.

CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos, é possível concluir que:

A 4-metilesculetina e a piperina, quando administradas isoladamente, apresentaram um caráter anti-inflamatório intestinal através da modulação do estresse oxidativo, demonstrado através da redução da MPO e do escore do IAD, porém sem modular a microbiota. Já o grupo da associação da 4-ME+PIP, apesar de apresentar também uma atividade anti-inflamatória e antioxidante através da redução do MPO e do IAD e uma não modulação da microbiota, não foi possível observar em nenhuma das análises um sinergismo ou potencialização do efeito farmacológico pela associação dos compostos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] ABDEL_DAIM, M. M. et al. Piperina Enhances the Antioxidant and Anti-Inflammatory Activities of Thymoquinone Against Microcystin-LR-Induced Hepatotoxicity and Neurotoxicity in Mice. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, v. 2019, p. 1-10, 16 abr. 2019.
- [2] LUIZ et al. Dietary intervention with green dwarf banana flour (*Musa sp. AAA*) modulates oxidative stress and colonic SCFAs production in the TNBS model of intestinal inflammation. *Journal of Functional Foods*, v. 38, p. 497–504, 1 nov. 2017.
- [3] AGUSTÍ, A. et al. Interplay Between the Gut-Brain Axis, Obesity and Cognitive Function. *Frontiers in Neuroscience*, v. 12, 16 mar. 2018.
- [4] ANANTHAKRISHNAN, A. N. et al. Environmental triggers in IBD: a review of progress and evidence. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, v. 15, n. 1, p. 39–49, 11 out. 2017.
- [5] ANANTHAKRISHNAN, A. N. Epidemiology and risk factors for IBD. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, v. 12, n. 4, p. 205–217, 3 mar. 2015.
- [6] BESSEY, O. A. et al. A method for the rapid determination of alkaline phosphatase with five cubic millimeters of serum. *Journal of Biological Chemistry*, v. 164, n. 1, p. 321–329, jul. 1946.
- [7] ALVES, B. / O. / O.-M. 19/5 – Dia Mundial da Doença Inflamatória Intestinal: “DII não tem idade” | Biblioteca Virtual em Saúde MS. Disponível em: <<https://bvsmms.saude.gov.br/19-5-dia-mundial-da-doenca-inflamatoria-intestinal-dii->>. Acesso em: 11 jul. 2024.
- [8] BOURGONJE, A. R. et al. Oxidative Stress and Redox-Modulating Therapeutics in Inflammatory Bowel Disease. *Trends in Molecular Medicine*, v. 26, n. 11, p. 1034–1046, nov. 2020.
- [9] CAMUESCO, D. et al. Intestinal anti-inflammatory activity of combined quercitrin and dietary olive oil supplemented with fish oil, rich in EPA and DHA (n-3) polyunsaturated fatty acids, in rats with DSS-induced colitis. *Clinical Nutrition*, v. 25, n. 3, p. 466–476, jun. 2006.
- [10] CARABOTTI, M et al. The gut-brain axis: interactions between enteric microbiota, central and enteric nervous systems. *PubMed*, v. 28, n. 2, p. 203–209, 2 abr. 2015.
- [11] CIRCU, M. L.; AW, T. Y. Glutathione and modulation of cell apoptosis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, v. 1823, n. 10, p. 1767–1777, out. 2012.

[12] CRISÓSTOMO, L.; OLIVEIRA, P. F.; ALVES, M. G. Antioxidants, Oxidative Stress, and Non-Communicable Diseases. **Antioxidants**, v. 11, n. 6, p. 1080, 29 maio 2022.

[13] DALILE, B. et al. The role of short-chain fatty acids in microbiota–gut–brain communication. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v. 16, n. 8, p. 461–478, 23 maio 2019.

[14] DAVIES, M. J. Myeloperoxidase-derived oxidation: mechanisms of biological damage and its prevention. **Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition**, v. 48, n. 1, p. 8–19, 2010.

[15] DI STASI, L. C. Coumarin Derivatives in Inflammatory Bowel Disease. **Molecules**, v. 26, n. 2, p. 422, 15 jan. 2021.

[16] DI STASI L.C. Natural Coumarin Derivatives Activating Nrf2 Signaling Pathway as Lead Compounds for the Design and Synthesis of Intestinal Anti-Inflammatory Drugs. **Pharmaceuticals**, v. 16, n. 4, p. 511–511, 30 mar. 2023.

[17] DI STASI et al. Products for the treatment of inflammatory bowel disease: a patent review (2013 – 2014). **Expert Opinion on Therapeutic Patents**, v. 25, n. 6, p. 629–642, 5 maio 2015.

[18] ALATAB, S. et al. The global, regional, and national burden of inflammatory bowel disease in 195 countries and territories, 1990–2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. **The Lancet Gastroenterology & Hepatology**, v. 5, n. 1, p. 17–30, jan. 2020.

[19] GBD. The global, regional, and national burden of inflammatory bowel disease in 195 countries and territories, 1990–2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. **The Lancet Gastroenterology & Hepatology**, v. 5, n. 1, p. 17–30, 2020.

[20] GHOSH, S. et al. New tools and approaches for improved management of inflammatory bowel diseases. **Journal of Crohn's and Colitis**, v. 8, n. 10, p. 1246–1253, 1 out. 2014.

[21] GHOURI, Y. A.; TAHAN, V.; SHEN, B. Secondary causes of inflammatory bowel diseases. **World Journal of Gastroenterology**, v. 26, n. 28, p. 3998–4017, 28 jul. 2020.

[22] GUO, G. et al. Piperine, a functional food alkaloid, exhibits inhibitory potential against TNBS-induced colitis via the inhibition of $\text{I}\kappa\text{B-}\alpha/\text{NF-}\kappa\text{B}$ and induces tight junction protein (claudin-1, occludin, and ZO-1) signaling pathway in experimental mice. **Human & Experimental Toxicology**, v. 39, n. 4, p. 477–491, 1 abr. 2020.

[23] GUPTA, R. A. et al. Effect of piperine on inhibition of FFA induced TLR4 mediated inflammation and amelioration of acetic acid induced ulcerative colitis in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 164, p. 239–246, abr. 2015.

- [24] HEIDARI, H. et al. Curcumin-piperine co-supplementation and human health: A comprehensive review of preclinical and clinical studies. **Phytotherapy Research**, 31 jan. 2023.
- [25] HEWLINGS, S.; KALMAN, D. Curcumin: A Review of Its' Effects on Human Health. **Foods**, v. 6, n. 10, p. 92, 22 out. 2017.
- [26] HU, D. et al. The protective effect of piperine on dextran sulfate sodium induced inflammatory bowel disease and its relation with pregnane X receptor activation. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 169, p. 109–123, 1 jul. 2015.
- [27] HUANG, C. S. et al. Amino acid sequence of rat kidney glutathione synthetase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 92, n. 4, p. 1232–1236, 14 fev. 1995.
- [28] J.E. KRAWISZ; SHARON, P.; STENSON, W. F. Quantitative assay for acute intestinal inflammation based on myeloperoxidase activity. **Gastroenterology**, v. 87, n. 6, p. 1344–1350, 1 dez. 1984.
- [29] KONDAPALLI, N. B. et al. Ocimum sanctum, Zingiber officinale, and Piper nigrum extracts and their effects on gut microbiota modulations (prebiotic potential), basal inflammatory markers and lipid levels: oral supplementation study in healthy rats. **Pharmaceutical Biology**, v. 60, n. 1, p. 437–450, 1 dez. 2022.
- [30] KUSUMOTO, J. et al. Malocclusion impairs cognitive behavior via AgRP signaling in adolescent mice. **Frontiers in Neuroscience**, v. 17, 24 abr. 2023.
- [31] KRZYSZEK-KORPACKA, M. et al. Oxidative Stress Markers in Inflammatory Bowel Diseases: Systematic Review. **Diagnostics**, v. 10, n. 8, p. 601, 17 ago. 2020.
- [32] LAKES, J. E.; RICHARDS, C. I.; FLYTHE, M. D. Inhibition of Bacteroidetes and Firmicutes by select phytochemicals. **Anaerobe**, v. 61, p. 102145, fev. 2020.
- [33] LI, Q. et al. Curcumin–piperine mixtures in self-microemulsifying drug delivery system for ulcerative colitis therapy. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 490, n. 1-2, p. 22–31, 25 jul. 2015.
- [34] LU, Q.-Y. et al. Prebiotic Potential and Chemical Composition of Seven Culinary Spice Extracts. **Journal of Food Science**, v. 82, n. 8, p. 1807–1813, 5 jul. 2017.

- [35] NIRMAL, S. A. et al. Amaranthus roxburghianus root extract in combination with piperine as a potential treatment of ulcerative colitis in mice. **Journal of Integrative Medicine/Journal of integrative medicine**, v. 11, n. 3, p. 206–212, 1 maio 2013.
- [36] O’NEILL, C. A. et al. The gut-skin axis in health and disease: A paradigm with therapeutic implications. **BioEssays**, v. 38, n. 11, p. 1167–1176, 24 ago. 2016.
- [37] POLAK, K. et al. Microbiome Modulation as a Therapeutic Approach in Chronic Skin Diseases. **Biomedicines**, v. 9, n. 10, p. 1436, 10 out. 2021.
- [38] PAYNE, A. N. et al. Advances and perspectives in in vitro human gut fermentation modeling. **Trends in Biotechnology**, v. 30, n. 1, p. 17–25, jan. 2012.
- [39] RAMIREZ-FARIAS, C. et al. Effect of inulin on the human gut microbiota: stimulation of Bifidobacterium adolescentis and Faecalibacterium prausnitzii. **British Journal of Nutrition**, v. 101, n. 4, p. 541–550, 1 jul. 2008.
- [40] SHAGALEEVA, O. Y. et al. GC-MS with Headspace Extraction for Non-Invasive Diagnostics of IBD Dynamics in a Model of DSS-Induced Colitis in Rats. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 25, n. 6, p. 3295–3295, 2024.
- [41] SEYEDSADJADI, N. The Potential Benefit of Monitoring Oxidative Stress and Inflammation in the Prevention of Non-Communicable Diseases (NCDs). **Antioxidants**, v. 10, n. 1, p. 15, 27 dez. 2020.
- [42] SHIN, Y. et al. Roles of Short-Chain Fatty Acids in Inflammatory Bowel Disease. **Nutrients**, v. 15, n. 20, p. 4466, 2023.
- [43] SUN, M. et al. **Microbiota metabolite short chain fatty acids, GPCR, and inflammatory bowel diseases.** **Journal of Gastroenterology** Springer Tokyo, , 1 jan. 2017.
- [44] JÚNIOR, S. et al. The use of an alternative feed additive, containing benzoic acid, thymol, eugenol, and piperine, improved growth performance, nutrient and energy digestibility, and gut health in weaned piglets. **Journal of animal science/Journal of animal science ... and ASAS reference compendium**, v. 98, n. 5, 13 abr. 2020.
- [45] DE SOUZA, H. S. P.; FIOCCHI, C. Immunopathogenesis of IBD: current state of the art. **Nature Reviews. Gastroenterology & Hepatology**, v. 13, n. 1, p. 13–27, 1 jan. 2016.
- [46] SMITH, P. K. et al. Measurement of protein using bicinchoninic acid. **Analytical Biochemistry**, v. 150, n. 1, p. 76–85, out. 1985.
- [47] SINGH, S. B.; LIN, H. C. Role of Intestinal Alkaline Phosphatase in Innate Immunity. **Biomolecules**, v. 11, n. 12, p. 1784, 29 nov. 2021.

- [48] TANIMOTO, A. et al. 4-Methylesculetin, a natural coumarin with intestinal anti-inflammatory activity, elicits a glutathione antioxidant response by different mechanisms. **Chemico-biological interactions**, v. 315, p. 108876–108876, 1 jan. 2020.
- [49] TIAN, T.; WANG, Z.; ZHANG, J. Pathomechanisms of Oxidative Stress in Inflammatory Bowel Disease and Potential Antioxidant Therapies. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2017, p. 1–18, 2017.
- [50] VENEGAS, D. et al. Short Chain Fatty Acids (SCFAs)-Mediated Gut Epithelial and Immune Regulation and Its Relevance for Inflammatory Bowel Diseases. **Frontiers in Immunology**, v. 10, n. 277, 11 mar. 2019.
- [51] WITAICENIS, A.; SEITO, L. N.; DI STASI, L. C. Intestinal anti-inflammatory activity of esculetin and 4-methylesculetin in the trinitrobenzenesulphonic acid model of rat colitis. **Chemico-Biological Interactions**, v. 186, n. 2, p. 211–218, jul. 2010.
- [52] WITAICENIS, A. et al. Suppression of TNBS-induced colitis in rats by 4-methylesculetin, a natural coumarin: Comparison with prednisolone and sulphasalazine. **Chemico-Biological Interactions**, v. 195, n. 1, p. 76–85, 1 jan. 2012.
- [53] WITAICENIS, A. et al. Antioxidant and intestinal anti-inflammatory effects of plant-derived coumarin derivatives. **Phytomedicine**, v. 21, n. 3, p. 240–246, fev. 2014.
- [54] WITAICENIS, A. et al. 4-methylesculetin, a coumarin derivative, ameliorates dextran sulfate sodium-induced intestinal inflammation. **Chemico-biological interactions (Print)**, v. 280, p. 59–63, 1 jan. 2018.
- [55] ZAHER, D. M. et al. Recent advances with alkaline phosphatase isoenzymes and their inhibitors. **Archiv Der Pharmazie**, v. 353, n. 5, p. e2000011, 1 maio 2020.
- [56] ZHANG, Y.-Z.; LI, Y.-Y. Inflammatory bowel disease: Pathogenesis. **World Journal of Gastroenterology**, v. 20, n. 1, p. 91, 2014.