

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIA DE ALIMENTOS
MESTRADO EM TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

DANIELA CRISTINA DE SOUZA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DA SILIMARINA NANOENCAPSULADA FRENTE
A ENZIMAS COLINÉRGICAS**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

CAMPO MOURÃO

2022

DANIELA CRISTINA DE SOUZA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DA SILIMARINA NANOENCAPSULADA FRENTE
A ENZIMAS COLINÉRGICAS**

Evaluation of the activity of nanoencapsulated silymarin against cholinergic enzymes

Dissertação apresentada como requisito para obtenção do título de Mestre em Tecnologia de Alimentos da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR).
Orientador: Rafael Porto Ineu.
Coorientador: Odinei Hess Gonçalves.

CAMPO MOURÃO

2022



[4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/)

Esta licença permite que outros remixem, adaptem e criem a partir do trabalho para fins não comerciais, desde que atribuam o devido crédito e que licenciem as novas criações sob termos idênticos. Conteúdos elaborados por terceiros, citados e referenciados nesta obra não são cobertos pela licença.



DANIELA CRISTINA DE SOUZA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DA SILIMARINA NANOENCAPSULADA FRENTE
A ENZIMAS COLINÉRGICAS**

Trabalho de pesquisa de mestrado apresentado como requisito para obtenção do título de Mestre em Tecnologia de Alimentos da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR). Área de concentração: Tecnologia de Alimentos.

Data de aprovação: 28 de março de 2022

Prof. Dr. Rafael Porto Ineu, Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Profa. Dra. Cristiane Canan, Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Profa. Dra. Rosemeire Aparecida da Silva de Lucca, Universidade Estadual do Oeste do Paraná

Documento gerado pelo Sistema Acadêmico da UTFPR a partir dos dados da Ata de Defesa em 28/03/2022

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus e a toda minha família, especialmente aos meus pais Divina Sebastiana de Souza e José Henrique Arantes de Souza, por sempre me apoiarem em todas as minhas escolhas, não pouparem esforços para que eu pudesse concluir meus estudos e principalmente por sempre acreditarem em mim.

Agradeço aos meus amigos, os de longa data da minha cidade, e aos anos novos amigos que o mestrado me proporcionou conhecer. E um agradecimento especial a Janmille Monteiro, que sempre esteve e estará ao meu lado até o fim, com sua alegria, generosidade e amor.

Agradeço ao meu orientador, Dr. Rafael Porto Ineu, pela oportunidade de aprendizado e por me acompanhar ao longo deste trabalho. Também agradeço ao meu coorientador Dr. Odinei Hess Gonçalves, por sempre está disposto a ajudar e contribuir com suas orientações.

Agradeço aos alunos do laboratório C005, Janmille, Pâmela, Dayane, Viviane, Nayara e Douglas por me acompanharem ao longo do mestrado, por nossas conversas e risadas ao longo das trocas. Um agradecimento especial a aluna de pós-doutorado, Patrícia Appelt, que com sua infinita bondade, paciência e orientação possibilitou que esse trabalho fosse desenvolvido.

E por fim, agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001 pela bolsa concedida, a CENTRAL ANALÍTICA MULTIUSUÁRIO DA UTFPR CAMPO MOURÃO (CAMulti-CM) e a CENTRAL DE ANÁLISES – UTFPR Campus Pato Branco pela realização das análises.

RESUMO

A silimarina é uma mistura complexa de compostos bioativos caracterizados como flavonolignanos, extraída das sementes e do fruto da planta *Silybum marianum* pertencente à família das Asteraceae e nativa da região Mediterrânea. A silimarina apresenta propriedades antioxidante, anti-inflamatória e antiviral, atenuando os efeitos colaterais do estresse oxidativo através da eliminação de radicais livres, participando da síntese de proteínas, e tem sido utilizada para o tratamento de hepatite crônica e cirrose. Entretanto, vários estudos demonstram que os componentes presentes na silimarina apresentam baixa solubilidade em meios aquosos e baixa biodisponibilidade oral, limitando sua utilização como antioxidante. A técnica de nanoencapsulação por dispersão sólida protege o composto bioativo das condições ambientais desfavoráveis, além de aumentar sua biodisponibilidade e estabilidade. Assim, o objetivo deste trabalho foi produzir e caracterizar nanopartículas de silimarina obtidas por dispersão sólida e encapsuladas com o polímero Poloxamer 407, além disso, avaliar a toxicidade e a atividade *in vitro* e *ex vivo*, a partir de homogeneizado de moscas *Drosophila melanogaster*, da silimarina e nanopartículas de silimarina frente às enzimas colinérgicas acetilcolinesterase (AChE) e butirilcolinesterase (BChE). As nanopartículas foram caracterizadas por análises de Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC), Espectrofotometria de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR), Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS) e Potencial Zeta. As técnicas de caracterização mostraram que a silimarina foi encapsulada de forma eficiente na matriz polimérica, e através do UV-VIS pôde-se observar que não há indícios de degradação dos compostos presentes nas nanopartículas. Os resultados obtidos para a atividade da enzima AChE e BChE *in vitro*, demonstraram que a silimarina e as nanopartículas têm capacidade de inibir as enzimas colinérgicas, apresentando melhores resultados para a silimarina quando solubilizada em etanol, afirmando a natureza hidrofóbica do composto. As nanopartículas possibilitaram a solubilidade da silimarina em água, proporcionando que o composto inibisse a atividade das enzimas. Por fim, a silimarina não apresentou toxicidade para *Drosophila melanogaster* quando avaliado pelo teste de sobrevivência.

Palavras-chave: silimarina; nanoencapsulação; acetilcolinesterase; butirilcolinesterase.

ABSTRACT

Silymarin is a complex mixture of bioactive compounds characterized as flavonolignans, extracted from the seeds and fruit of the plant *Silybum marianum* belonging to the Asteraceae family which is native to the Mediterranean region. Silymarin has antioxidant, anti-inflammatory and antiviral properties, attenuating the side effects of oxidative stress through the elimination of free radicals, participating in protein synthesis. It has also been used for the treatment of chronic hepatitis and cirrhosis. However, several studies demonstrated that the components present in silymarin have low solubility in aqueous and low oral bioavailability, resulting in a limitation in its use as an antioxidant. The solid dispersion nanoencapsulation technique is known to protect bioactive compounds from unfavorable environmental conditions, in addition to increase its bioavailability and stability. Thus, the objective of this work was to produce and characterize silymarin nanoparticles obtained by solid dispersion and encapsulated with the Poloxamer 407 polymer, and also to evaluate the *in vitro* and *ex vivo* activity, through tissue homogenized *Drosophila melanogaster* flies, silymarin and silymarin nanoparticles against the cholinergic enzyme acetylcholinesterase (AChE) and butyrylcholinesterase (BChE). The nanoparticles were characterized by Differential Scanning Calorimetry (DSC) and Fourier Transform Infrared Spectrophotometry (FTIR), Dynamic Light Scattering (DLS) and Zeta Potential analyses. The characterization techniques showed that silymarin was efficiently encapsulated in the polymeric matrix, and through UV-VIS it could be observed that there is no evidence of degradation of the compounds present in the nanoparticles. The results obtained for the activity of the enzyme AChE and BChE *in vitro*, showed that silymarin and nanoparticles have the capacity to inhibit cholinergic enzymes, showing better results for free silymarin when solubilized in ethanol, confirming the hydrophobic nature of compound. The nanoparticles enabled the solubility of silymarin in water, allowing the compound to inhibit the activity of enzymes. Finally, silymarin showed no toxicity to *Drosophila melanogaster* when evaluated by the survival test.

Keywords: silymarin; nanoencapsulation; acetylcholinesterase; butyrylcholinesterase.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Planta <i>Silybum marianum</i> fonte do composto bioativo silimarina.	15
Figura 2: Estrutura química dos flavonolignanos e flavonoides que compõem o complexo silimarina.	16
Figura 3: Estrutura do polímero Poloxamer 407, composto por três blocos, um bloco central de óxido de polipropileno hidrofóbico e dois blocos de óxido de polietileno hidrofílicos.	19
Figura 4: Fisiologia da sinapse colinérgica.	20
Figura 5: Ciclo de vida da <i>Drosophila melanogaster</i>	23
Figura 6: Exemplo de como as moscas <i>Drosophila melanogaster</i> são mantidas em laboratório.	24
Figura 7: Representação esquemática do experimento <i>in vivo</i> com <i>Drosophila melanogaster</i> , de ambos os sexos, utilizando a silimarina e as nanopartículas de silimarina nas concentrações controle, 160; 210; 250 µg/mL, para avaliar a taxa de sobrevivência em um período de 5 dias, com 5 repetições.	28
Figura 8: Silimarina dispersa em água (A), silimarina em etanol (B), nanopartículas em água (C), nanopartículas em etanol (D).	31
Figura 9: Termogramas obtidos por DSC da silimarina, silimarina nanoencapsulada (NP), polímero P407 e da mistura física (MF).	31
Figura 10: Espectros no infravermelho (FTIR) do polímero P407, da mistura física (MF), das nanopartículas de silimarina (NP`s) e da silimarina.	33
Figura 11: Curvas TGA-DTGA: (A) silimarina, (B) nanopartículas de silimarina (NP) e (C) mistura física (MF).	34
Figura 12: Variação de pH da formulação de nanopartículas de P407 com silimarina no período compreendido entre zero a oito semanas de armazenamento em temperatura ambiente em frasco âmbar (n=2).	36
Figura 13: Espectro de UV-VIS da silimarina e nanopartículas de silimarina (NPs,) ambos em etanol nas concentrações de 18 µg/mL.	37
Figura 14: Sobreposição dos espectros de UV-VIS das nanopartículas (NPs) expostas e reservadas da luz por 60 dias, para a concentração de 18 µg/ML.	38
Figura 15: Curva de sobrevivência de <i>Drosophila melanogaster</i> com a dieta suplementada com A) silimarina em água, B) silimarina em etanol, C) nanopartículas em água, D) nanopartículas em etanol, nas concentrações de 160, 210 e 250 µg/mL. Os dados são apresentados como a média ± erro padrão. Cada ensaio foi realizado em cinco experiências independentes. O grupo controle recebeu dieta suplementada com água ou etanol.	39

Figura 16: Porcentagem de atividade *in vitro* da enzima AChE frente as NP-silimarina e silimarina, solubilizadas em água (A) e em etanol (B). Valores expressos em média ± erro (n=5 por grupo). A linha tracejada representa o valor do grupo controle. Significância determinada pela análise de variância unidirecional (ANOVA) seguida do teste de Tukey (** p <0,01; *** p <0,001; **** p <0,0001 em comparação ao controle água e etanol).41

Figura 17: Porcentagem de atividade *in vitro* da enzima BChE frente as NP-silimarina e silimarina, solubilizadas em água (A) e em etanol (B). Valores expressos em média ± erro (n=5 por grupo). A linha tracejada representa o valor do grupo controle. Significância determinada pela análise de variância unidirecional (ANOVA) seguida do teste de Tukey (* p <0,05; ** p <0,01 em comparação ao controle água e etanol).42

Figura 18: Efeitos das nanopartículas de silimarina e silimarina sobre a atividade *ex vivo* da AChE no tecido de *Drosophila melanogaster*, em A) água e B) etanol. Valores expressos em média ± SEM (n = 5 por grupo). A linha tracejada representa o valor do grupo controle. Significância determinada pela análise de variância unidirecional (ANOVA) seguida do teste de Tukey (* p <0,05).43

Figura 19: Efeitos das nanopartículas de silimarina e silimarina sobre a atividade *ex vivo* da BChE no tecido de *Drosophila melanogaster*, em A) água e B) etanol. Valores expressos em média ± SEM (n = 5 por grupo). A linha tracejada representa o valor do grupo controle. Significância determinada pela análise de variância unidirecional (ANOVA) seguida do teste de Tukey (* p <0,05; ** p <0,01).44

Figura 20: Consumo alimentar em porcentagem das moscas em diferentes concentrações de silimarina e nanopartículas de silimarina, em água e etanol. Os dados são apresentados como a média ± erro padrão. Cada ensaio foi realizado em três experiências independentes. A linha tracejada representa o valor do grupo controle Significância determinada pela análise de variância unidirecional (ANOVA) seguida do teste de Tukey (* p <0,05; ** p <0,01 em comparação ao controle água ou etanol).47

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ac COA	acetil-coenzima
ACh	acetilcolina
AChE	acetilcolinesterase
ASCh	acetiltiocolina
BChE	butirilcolinesterase
BSCh	butiriltiocolina
ChAT	acetiltransferase
DSC	Calorimetria Diferencial de Varredura
DTNB	ácido 5,5`-ditio-bis-(2-nitrobenzoico)
FTIR	Espectrometria de Infravermelho com Transformada de Fourier
KBr	brometo de potássio
MF	mistura física
NaCl	cloreto de sódio
NP	nanopartículas
P407	poloxamer 407
pH	potencial hidrogeniônico
Tf	temperatura de fusão
TFK	tampão fosfato de potássio
TGA	análise termogravimétrica
UV-vis	ultravioleta e visível

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 OBJETIVOS	14
2.1 Objetivo geral	14
2.1.1 Objetivos específicos	14
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
3.1 Compostos bioativos	15
3.2 Silimarina	15
3.3 Técnica de encapsulação	17
3.4 Encapsulante polimérico	18
3.5 Atividade enzimática e sistema colinérgico	19
3.6 Toxicidade	21
3.7 <i>Drosophila melanogaster</i> como modelo biológico	22
4 MATERIAIS E MÉTODOS	25
4.1 Materiais	25
4.2 Obtenção das nanopartículas	25
4.3 Caracterização das nanopartículas	26
4.3.1 Medidas de estabilidade química.....	26
4.3.2 Espectroscopia na região do UV-VIS.....	27
4.4 Análises biológicas <i>in vivo</i>	27
4.4.1 Teste de sobrevivência.....	27
4.4 Análises <i>in vitro</i>	28
4.4.1 Atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE)	28
4.4.2 Atividade da enzima butirilcolinesterase (BChE)	28
4.5 Ensaio <i>ex vivo</i>	29
4.5.1 Preparação do homogeneizado	29
4.5.2 Atividade da acetilcolinesterase (AChE) e butirilcolinesterase (BChE).....	29
4.6 Consumo alimentar	29
4.7 Análise estatística	30
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
5.1 Caracterização das nanopartículas	31
5.1.1 Análise termogravimétrica (TGA).....	34
5.1.2 Medidas de estabilidade química.....	36
5.1.3 Espectroscopia na região do UV-VIS.....	37
5.2 Ensaio <i>in vivo</i>	39
5.2.1 Teste de sobrevivência.....	39

5.3	Ensaio<i>s</i> <i>in vitro</i> e <i>ex vivo</i>	41
5.3.1	Atividade das enzimas acetilcolinesterase e butirilcolinesterase	41
5.4	Consumo alimentar	46
6	CONCLUSÃO	48
	REFERÊNCIAS	49

1 INTRODUÇÃO

Os compostos bioativos são produzidos no metabólito secundário das plantas, são constituintes que ocorrem em pequenas quantidades nos alimentos e quando inseridos na dieta trazem benefícios para a saúde (AZMIR et al., 2013). O aumento na busca por esses compostos impulsionado pela pesquisa científica, se deve ao fato dessas moléculas terem ação contra várias doenças, tendo funções antimicrobiana, antiviral, anticolinesterases e antioxidante (DA SILVA; ROCHA-SANTOS; DUARTE, 2016). Entre esses compostos, a silimarina é um composto bioativo extraído da espécie *Silybum marianum L. Gaertn* e consiste em uma mistura complexa de flavonoides, os flavonolignanos (BIJAK, 2017).

A silimarina possui diversas atividades biológicas como anticâncer, cardioprotetor, atividades hipocolesterolêmicas e neuroprotetoras (ELATEEQ et al., 2020). No entanto, é um composto com baixa solubilidade e biodisponibilidade em água e apenas 20 a 50% do extrato é absorvido no intestino após a administração por via oral (ABOSHANAB et al., 2020), sendo atribuída essa absorção devido à baixa solubilidade em água e pela degeneração pelo fluido gástrico (VALKOVÁ et al., 2020). A solubilidade da silibinina, principal constituinte da silimarina é influenciada pelo pH por ser um composto fenólico, apresentando uma melhor capacidade de dissolução com o aumento do pH, devido à ionização do grupo fenólico (THEODOSIOU et al., 2014).

A técnica de encapsulação é um procedimento que consiste em aprisionar um determinado composto de interesse dentro de um material encapsulante, com o intuito de preservar as atividades biológicas, aumentar a solubilidade e a biodisponibilidade desses compostos (WEN et al., 2017). A nanotecnologia é cada vez mais utilizada na ciência alimentar, sendo uma de suas linhas de pesquisa a nanoencapsulação de compostos bioativos (BAZANA; CODEVILLA; DE MENEZES, 2019).

As nanopartículas poliméricas são sistemas carreadores de fármacos que apresentam diâmetro inferior a 1 μm (SCHAFFAZICK et al., 2003), sendo utilizadas diferentes técnicas de caracterização para a análise de várias propriedades físico-químicas das nanopartículas, como caracterizações morfológicas, estruturais, de tamanho da partícula e área de superfície (KHAN; SAEED; KHAN, 2019).

Dentre as técnicas de nanoencapsulação, as nanopartículas podem ser produzidas pela técnica de dispersão sólida, que consiste em dispersar o composto em uma matriz polimérica (HUANG; DAI, 2014), sendo considerado um dos métodos mais adequados para melhorar as

taxas de dissolução e, portanto, a biodisponibilidade de compostos pouco solúveis em água (YU et al., 2011). O polímero em bloco conhecido comercialmente por Poloxamer P407 é constituído por um sistema central de óxido de polipropileno e dois blocos de óxido de polietileno, e tem sido estudado por sua capacidade de solubilizar diferentes compostos (SIMONAZZI et al., 2018), sendo um candidato promissor para melhorar as propriedades tecnológicas de compostos bioativos hidrofóbicos.

As enzimas colinesterases, acetilcolinesterase (AChE) (EC 3.1.1.7) e butirilcolinesterase (BChE) (E.C.3.1.1.8), presentes nas sinapses colinérgicas, atuam catalisando a hidrólise do neurotransmissor acetilcolina (ACh), convertendo-o em acetato e colina, impedindo a transmissão de mensagens de um neurônio para outro (ARAÚJO; SANTOS; GONSALVES, 2016). A acetilcolina é um neurotransmissor que faz parte do sistema colinérgico no sistema nervoso central e periférico, e tem um papel importante no desempenho das funções cognitivas (KUMAR; SAHA; ROY, 2020), participando no controle do fluxo sanguíneo cerebral, na modulação de desempenhos cognitivos e nos processos de aprendizagem e memória (SCHLIEBS; ARENDT, 2011). A principal diferença entre as duas enzimas é o substrato, pois a AChE hidrolisa especificamente a acetilcolina, enquanto a BChE também está envolvida na hidrólise da ACh, e apresenta mais especificidade pelo substrato butirilcolina (LI et al., 2017).

Os inibidores das colinesterases são utilizados para limitar a degradação da ACh, aumentando assim os níveis colinérgicos (SHARMA, 2019). Na literatura, a silimarina é citada como um possível inibidor da atividade das enzimas colinesterases, AChE e BChE, exercendo um efeito positivo contra doenças neurodegenerativas, como a Doença de Alzheimer, atuando através da elevação dos níveis de acetilcolina no cérebro (HADDADI; SHAHIDI; EYVARI-BROOSHGHAN, 2020).

A nanotecnologia tem mostrado um constante crescimento, e nesse cenário a nanotoxicologia vem surgindo para avaliar o potencial tóxico desses nanomateriais, bem como seus mecanismos de ação, sendo utilizados para essa avaliação estudos in vivo (ALARABY et al., 2015). O efeito tóxico das nanopartículas depende do seu tamanho, composição química, estrutura da superfície, solubilidade e forma. Outro fator relevante, é a rota de exposição, que pode ser dérmica, pulmonar e gastrointestinal (ÁVILA; RONCATO; JACQUES, 2018).

As *Drosophila melanogaster* são utilizadas como um modelo para estudos de toxicidade de compostos, por apresentar facilidades se comparado a outros modelos animais, o curto período de vida, não implica em preocupações éticas, facilidade na manipulação e manutenção

e apresenta alta homologia com os genomas humanos, tornando a mosca útil nas pesquisas em áreas biomédicas (OBOH et al., 2021). Além disso, por apresentar uma alta sensibilidade às substâncias tóxicas é considerado um útil modelo para estudos de toxicidade, bem como para a avaliação da ação biológica de compostos ativos (ADEDARA et al., 2016).

Nesse contexto, o estudo visa à nanoencapsulação e a caracterização da silimarina através da técnica de dispersão sólida, bem como a realização de estudos *in vitro* com enzimas isoladas, *in vivo* e *ex vivo* em *Drosophila melanogaster* da silimarina e nanoencapsulada frente às enzimas AChE e BChE, a fim de analisar o potencial inibidor desse composto bioativo.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar a influência da silimarina e da silimarina nanoencapsulada sobre as enzimas acetilcolinesterase e butirilcolinesterase por meio de ensaios *in vitro*, *in vivo* e *ex vivo*.

2.1.1 Objetivos específicos

Como objetivos específicos, podem ser listados:

- Produzir nanopartículas contendo silimarina pela técnica de dispersão sólida utilizando Poloxamer 407 como encapsulante;
- Caracterizar as nanopartículas pelas técnicas de Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC) a fim de investigar o comportamento térmico das amostras; Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) para investigar possíveis interações químicas entre os compostos; bem como realizar análises de potencial zeta para analisar a estabilidade coloidal das nanopartículas, tamanho médio das nanopartículas e a Termogravimetria (TGA) para analisar a estabilidade térmica das amostras;
- Verificar a estabilidade química das formulações através das medições de pH e de Espectroscopia UV-vis das nanopartículas ao longo do tempo;
- Avaliar a partir de testes *in vivo*, os efeitos das nanopartículas de silimarina na curva de sobrevivência em *Drosophila melanogaster*, com o intuito de analisar os possíveis efeitos tóxicos da silimarina e das nanopartículas nas moscas;
- Avaliar a atividade *in vitro* da silimarina e das nanopartículas de silimarina frente à enzima colinérgica acetilcolinesterase (AChE) e butirilcolinesterase (BChE);
- Determinar em testes *ex vivo* as atividades das enzimas colinérgicas (AChE e BChE) utilizando tecido homogeneizado de moscas da espécie *Drosophila melanogaster*;
- Realizar análise de consumo alimentar para determinar a quantidade de alimento ingerido pelas moscas *Drosophila melanogaster* nas diferentes concentrações.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Compostos bioativos

Os alimentos fornecem vários nutrientes essenciais para a vida, bem como moléculas e componentes com propriedades bioativas que estão envolvidas na melhoria da saúde e proteção contra doenças (SAMTIYA et al., 2021). Os compostos bioativos são substâncias encontradas em frutas, vegetais, óleos, legumes ou produzidos sinteticamente, participam do metabolismo secundário das plantas e apresentam um impacto positivo na saúde humana devido a suas atividades celulares e fisiológicas, possuindo atividade antioxidante, anti-inflamatória e anticancerígena (ESSIEN; YOUNG; BAROUTIAN, 2020).

Os exemplos mais comuns de compostos derivados de plantas são os ácidos graxos essenciais, carotenoides, tocoferóis, flavonoides, polifenóis e vitaminas lipossolúveis (MARSANASCO et al., 2015). A estabilidade desses compostos é um fator crítico que influencia na sua utilização para incorporação em produtos alimentares. São sensíveis a luz, calor, oxigênio e apresentam uma baixa solubilidade em água, sendo esses fatores limitantes na sua biodisponibilidade (ĐORĐEVIĆ et al., 2014).

3.2 Silimarina

A silimarina é um composto bioativo extraído das sementes e do fruto da planta *Silybum marianum*, sendo uma planta conhecida popularmente como cardo leiteiro (Figura 1), pertencente à família Asteraceae e originária da região Mediterrânea (ANDRZEJEWSKA; MARTINELLI; SADOWSKA, 2015). Nos últimos anos, seu estudo tem se concentrado em suas propriedades antioxidante, anti-inflamatória e antiviral, e gerado interesse nas áreas de medicina, farmacêutica e veterinária (KIM et al., 2019).

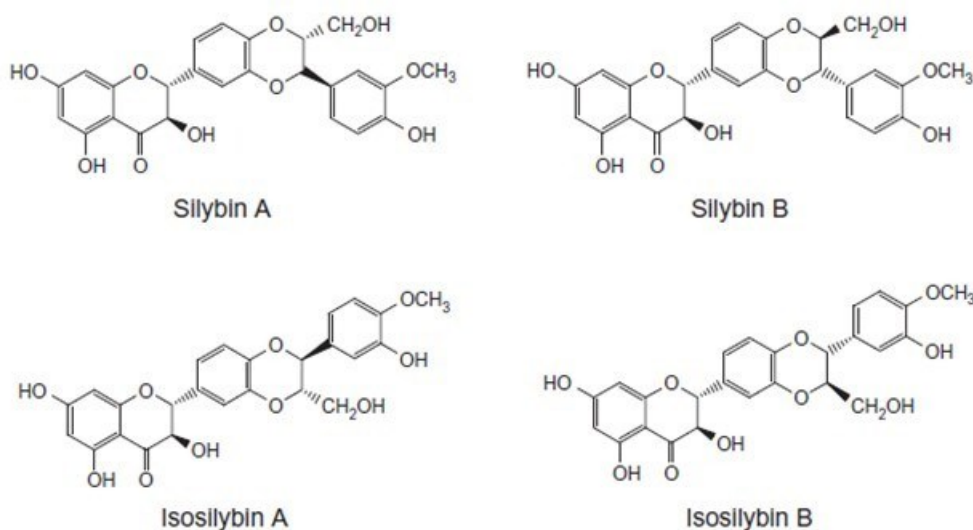
Figura 1: Planta *Silybum marianum* fonte do composto bioativo silimarina.



Fonte: Abouzid et al. (2016)

A composição da silimarina consiste em uma mistura de flavonolignanos, como a silibinina A e B (50-70 %), isosilibinina A e B (cerca de 5 %), silicristina e silidianina (20 %), além de flavonoides como a taxifolina (Figura 2), sendo a silibinina sua principal constituinte (ABOUZID et al., 2016; BALIGA et al., 2013; RAJNOCHOVÁ SVOBODOVÁ et al., 2016).

Figura 2: Estrutura química dos flavonolignanos e flavonoides que compõem o complexo silimarina.



Fonte: Abouzid et al. (2016)

Estudos mostram que os componentes presentes na silimarina apresentam baixa solubilidade em meios aquosos e lipídicos (THEODOSIOU et al., 2014) e baixa biodisponibilidade oral, tendo a silibinina uma absorção pelo trato intestinal de apenas 20-50% (SORNSUVIT et al., 2018).

De acordo com Abenavoli et al. (2010), cerca de 20 a 50% da silimarina é absorvida pelo trato gastrointestinal, sendo que 80% do que é absorvido é excretado pela bile e 10% sofre circulação entero-hepática. A silimarina atua como antioxidante, atenuando os efeitos colaterais do estresse oxidativo através da eliminação de radicais livres (YOUSEFDOOST et al., 2019), participa na síntese de proteínas, e tem sido utilizada para o tratamento de hepatite crônica e cirrose (YANG et al., 2013).

Para proporcionar um aumento da solubilidade da silimarina em meio aquoso, várias abordagens tecnológicas têm sido estudadas como auto emulsionantes, formulação com lecitina e formação em dispersão sólida (YOUSAF et al., 2019).

3.3 Técnica de encapsulação

Uma característica dos bioativos é sua rápida inativação ou degradação, sendo a encapsulação uma técnica que atrasa os processos de degradação, até que o bioativo seja adsorvido pelo organismo (DE VOS et al., 2010). Segundo Donsi et al. (2011), os compostos bioativos são altamente lipofílicos e apresentam uma baixa solubilidade em água, portanto uma menor biodisponibilidade, devido a isso, houve um aumento em pesquisas envolvendo a técnica de encapsulação.

A técnica de encapsulamento é um procedimento no qual os compostos bioativos a serem encapsulados (antioxidantes, vitaminas, ácidos graxos, licopeno, entre outros) são envoltos por uma barreira física chamada de revestimento ou cápsula, com o intuito de realizar a proteção desses compostos (NEDOVIC et al., 2011). Este método traz benefícios como a preservação das propriedades funcionais, melhoria da estabilidade e o aumento da biodisponibilidade (GARAVAND et al., 2019).

A nanoencapsulação, com tamanhos na escala de 10^{-9} m, é uma alternativa para preservar e proteger os compostos bioativos de condições ambientais desfavoráveis, além de aumentar sua biodisponibilidade e estabilidade (BAZANA; CODEVILLA; DE MENEZES, 2019). Além disso, contribui para uma melhor adesão do composto no muco intestinal, prolongando o tempo de retenção gastrointestinal (ANANDHARAMAKRISHNAN, 2014), protegendo os compostos instáveis contra as condições desfavoráveis, proporcionando a liberação controlada dos compostos no meio em que se encontram, nos alimentos ou no corpo (REZAEI; FATHI; JAFARI, 2019).

Na literatura, são relatadas várias técnicas para realização da nanoencapsulação, que incluem as nanoemulsões, nanosuspensões, nanolipossomas, nanopartículas em biopolímeros e micelas feitas de polissacarídeos e proteínas (PATEIRO et al., 2021). Dentre os métodos utilizados na nanoencapsulação, destaca-se a técnica de dispersão sólida. Esta técnica é definida como sendo a dispersão de um ou mais componentes ativos em uma matriz transportadora inerte (CHAUDHARI; DUGAR, 2017), contribuindo para aumentar a solubilidade e estabilidade de compostos pouco solúveis em água (BAGHEL; CATHCART; O'REILLY, 2016; HE; HO, 2015). A formulação de dispersão sólida contribui para converter um composto de sua forma cristalina para a amorfa, com o intuito de aumentar a sua biodisponibilidade através da melhora na cinética de dissolução (WANI et al., 2021).

As dispersões sólidas podem ser obtidas através de dois métodos, o de fusão e o de evaporação do solvente. O de fusão consiste no aquecimento da mistura física (polímero e

composto), formando uma mistura fundida que é resfriada e solidificada. No método de evaporação do solvente (método do solvente), a dispersão é obtida após a evaporação do solvente na solução que contém o polímero e o composto, sendo um pré-requisito a solubilidade suficiente do composto e polímero no solvente. Neste método, solventes orgânicos como o etanol são comumente utilizados (BAGHEL; CATHCART; O'REILLY, 2016).

Além do composto e polímero, os surfactantes são utilizados no processo de produção das nanopartículas para conferir plastificação e solubilização e contribuindo para a redução da temperatura de transição vítrea do composto e do polímero. Além disso, o uso dos surfactantes, como o Tween 80, contribuem para a melhoria das características de dissolução e estabilidade do composto na matriz polimérica (WANI et al., 2021).

As nanopartículas obtidas por dispersão sólida podem ser utilizadas para lidar com a baixa solubilidade aquosa e de dissolução de algumas substâncias (YOUSAF et al., 2019), apresentando vantagens e aplicações farmacêuticas, entre elas a distribuição uniforme e homogênea de pequenas quantidades do fármaco no estado sólido, a estabilização de compostos instáveis, e a produção de sistemas de liberação prolongada ou o aumento das taxas de dissolução dos compostos (ALMEIDA; AMARAL; LOBÃO, 2012).

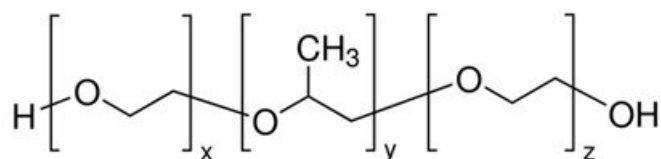
Silva de Sá et al. (2019) desenvolveram uma dispersão sólida de curcumina com os encapsulantes poli(etileno glicol) (PEG) e Poloxamer 407. Através das caracterizações foi comprovada que a curcumina foi encapsulada de forma eficiente nas matrizes poliméricas, além disso, os estudos *in vitro* mostraram que as nanopartículas de curcumina foram capazes de inibir a ação das enzimas AChE e BChE.

Balata e Shamrool (2014) encapsularam silimarina usando a técnica de dispersão sólida e o encapsulante polivinilpirrolidona. Foram avaliadas as propriedades das nanopartículas através das caracterizações (estudo da solubilidade, DSC e FTIR) e ensaios *in vivo* com ratos para o estudo da hepatotoxicidade das nanopartículas de silimarina. Os resultados mostraram que a encapsulação por dispersão sólida contribuiu para a melhora na dissolução e bioatividade da silimarina, e os estudos *in vivo* mostraram que a utilização das nanopartículas resultou no aumento da atividade hepática.

3.4 Encapsulante polimérico

O polímero Poloxamer 407 é um copolímero sintético composto por três blocos, um bloco central de óxido de polipropileno hidrofóbico e dois blocos de óxido de polietileno hidrofílico (Figura 3) (FAKHARI; CORCORAN; SCHWARZ, 2017).

Figura 3: Estrutura do polímero Poloxamer 407, composto por três blocos, um bloco central de óxido de polipropileno hidrofóbico e dois blocos de óxido de polietileno hidrofílicos.



Fonte: Adaptado de Saxena e Hussain (2013); $x=z=101$, $y=56$

Na literatura, consta que o Poloxamer 407 é utilizado como encapsulante devido à sua biocompatibilidade com os compostos, podendo atingir um alto grau de biodisponibilidade para compostos pouco solúveis em água e estabilizar dispersões sólidas. Além disso, são biodegradáveis, não tóxicos e estáveis, por isso seu uso é adequado para técnicas de encapsulamento (ELOY; MARCHETTI, 2014; PEREIRA et al., 2013).

Eloy e Marchetti (2014) desenvolveram e caracterizaram dispersões sólidas contendo ácido ursólico com os polímeros Poloxamer 407 e PEG 6000. As dispersões foram caracterizadas quanto ao tamanho das partículas, microscopia eletrônica de varredura, FTIR, Difractometria de raios-X, DSC e liberação do composto *in vitro*. O estudo mostrou que a dispersão sólida obtida com encapsulante Poloxamer 407 apresentou resultados mais satisfatórios quanto a solubilidade e taxa de dissolução se comparado com o encapsulante PEG 6000, isso devido as propriedades surfactantes do Poloxamer.

3.5 Atividade enzimática e sistema colinérgico

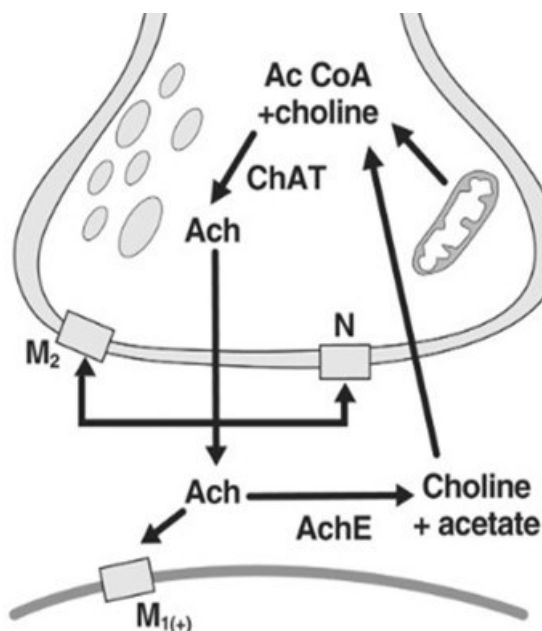
As enzimas são proteínas com alta massa molar que atuam como biocatalisadores. Apresentam alta especificidade e são responsáveis por catalisar as reações bioquímicas. Elas são sintetizadas pelos organismos vivos, e realizam os milhares dos processos biológicos que sustentam a vida (ARSALAN; YOUNUS, 2018; ORDÓÑEZ et al., 2005). Desempenham um papel essencial em vários processos incluindo metabolismo, expressão gênica, divisão celular e importantes reações de defesa do sistema imunológico, por isso são intensamente estudadas para sua aplicação em indústrias, biotecnologia, saúde humana e animal (PORTO DE SOUZA VANDENBERGHE et al., 2020).

As enzimas colinérgicas são responsáveis por catalisar a hidrólise do neurotransmissor acetilcolina em colina e ácido acético (COLOVIC et al., 2013), sendo que o cérebro dos mamíferos possuem duas enzimas colinérgicas, a acetilcolinesterase (AChE) (EC 3.1.1.7), encontrada no sistema nervoso, e a butirilcolinesterase (BChE) (E.C.3.1.1.8) presente

predominantemente no plasma sanguíneo (AGATONOVIC-KUSTRIN; KETTLE; MORTON, 2018). A AChE é uma enzima responsável especificamente pela hidrólise da ACh, tendo um papel fundamental para o funcionamento neural das vias colinérgicas (KHAN et al., 2018).

A acetilcolina é o principal neurotransmissor do cérebro, sendo responsável por uma série de funções, incluindo a cognição (JIANG; GAO; TURDU, 2017), fundamental para o funcionamento adequado da memória. Portanto, diversos problemas de saúde mental que envolvem a memória ou a perda dela, estão relacionados à alterações no metabolismo da ACh (ELUFIOYE et al., 2010). A Figura 4 ilustra as etapas na síntese, liberação e recepção do neurotransmissor acetilcolina.

Figura 4: Fisiologia da sinapse colinérgica.



Fonte: Hampel et al. (2018)

A acetil-coenzima A (Ac CoA) e a colina são condensadas pela enzima colina acetiltransferase (ChAT), realizando a síntese da acetilcolina (ACh). O neurotransmissor ACh ao ser liberado na sinapse, liga-se ao receptor pós-sináptico muscarínico (M1), transmitindo um sinal de um neurônio para os outros. O neurotransmissor ACh em excesso na fenda sináptica sofre hidrólise pela enzima AChE, sendo convertido em colina e acetato, que através do mecanismo de captação de reciclagem são devolvidos em acetil-coenzima A (HAMPEL et al., 2018).

De acordo com Sharma (2019), a redução da síntese de acetilcolina pode estar vinculada com a ocorrência de doenças neurodegenerativas, como a Doença de Alzheimer. Devido a isso,

a Doença de Alzheimer pode ser tratada com o restabelecimento dos níveis de acetilcolina, por meio da inibição das enzimas colinesterases: AChE e BChE (NAZIR et al., 2018).

Na literatura, a silimarina é apontada como um agente neuroprotetor contra as doenças neurodegenerativas, incluindo Alzheimer e Parkinson, devido sua capacidade de inibir o estresse oxidativo no cérebro (BORAH et al., 2013), aumentando os níveis de ACh no sistema colinérgico, através da inibição das enzimas colinesterases (GUO et al., 2019).

Nazir et al. (2018) mostraram o efeito do extrato metanólico de silimarina na melhoria da memória por meio de estudos *in vivo* realizados em camundongos bem como verificou através de estudos *in vitro* a inibição das enzimas colinesterases, acetilcolinesterase e butirilcolinesterase, e sua ação antioxidante. Concluiu que a silimarina é um composto que tem uma ação eficaz na melhoria a curto e longo prazo da disfunção de memória, agindo como uma fonte natural de inibição das enzimas colinesterases.

3.6 Toxicidade

Os testes de toxicidade são realizados com o objetivo de caracterizar o potencial que um determinado composto tem de causar efeitos nocivos em humanos, após a exposição. Podem ser determinados através de estudos *in vitro*, *in vivo*, em organismos uni ou pluricelulares (CAZARIN; CORRÊA; DUQUE ZAMBRONE, 2004).

O crescimento na produção e uso de nanopartículas tem contribuído para os estudos na área de toxicidade de nanopartículas, devido ao fato de pouco ainda se saber sobre os riscos à saúde e toxicidade desses nanomateriais (ZENG et al., 2014). Segundo Sundararajan et al. (2019), os efeitos tóxicos das nanopartículas dependem de propriedades físico-químicas, como tamanho, forma e química da superfície. Especificamente o tamanho da partícula e área de superfície são considerados dois fatores que contribuem diretamente com a nanotoxicidade (KHANNA et al., 2015).

Atualmente moscas *Drosophila melanogaster* têm sido utilizadas como modelo biológico para estudos de nanotoxicidade. Através da determinação de sobrevivência, as moscas são submetidas a exposição ao nanomaterial, com a adição desse composto diretamente no alimento disponibilizado para as moscas, em várias concentrações (ONG et al., 2015). Os seres humanos podem ser expostos aos nanomateriais por diversas vias, como por inalação, ingestão oral e pela via dérmica, sendo o trato intestinal, o sistema respiratório e nervoso central, os locais que podem ser mais afetados por nanopartículas (KHANNA et al., 2015).

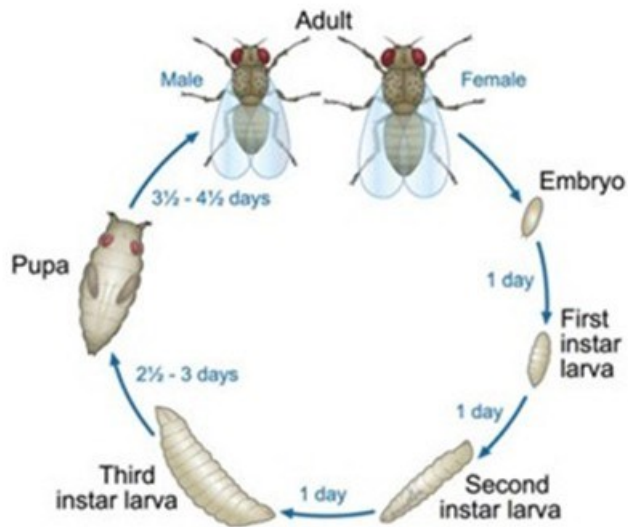
Sundararajan et al. (2019) avaliaram a potencial toxicidade de nanopartículas de óxido de cério em doses de 0,1 mM a 1 mM, utilizando a *Drosophila melanogaster* como modelo biológico, realizando ensaios comportamentais, bioquímicos e estudos de expressão genética. Com a utilização do modelo biológico *Drosophila*, os autores mostraram que as nanopartículas de óxido de cério nas concentrações de 0,1 mM a 1 mM não induziram o estresse oxidativo, efeitos comportamentais e neurotoxicidade em estudos *in vivo* nas moscas.

3.7 *Drosophila melanogaster* como modelo biológico

Vários organismos modelos são utilizados em pesquisas para a identificação de propriedades medicinais de plantas e outros compostos, sendo o principal e mais conhecido, os roedores. A *Drosophila melanogaster* tem sido utilizada como organismo modelo desde o século 20, sendo atualmente um dos modelos mais populares utilizados em laboratórios (PANCHAL; TIWARI, 2017), podendo ser utilizada em estudos de doenças infecciosas, nanotoxicidade, distúrbios neurodegenerativos, como Alzheimer, câncer e diabetes (DAN et al., 2019).

Popularmente conhecida como “mosca da fruta”, *Drosophila melanogaster* é um inseto minúsculo com aproximadamente 3 mm, com um ciclo de vida com duração de 60 dias, leva de 10 a 12 dias para os ovos se transformarem em uma mosca adulta, à temperatura de 25°C. São holometabólico e apresentam uma metamorfose completa de 4 estágios de desenvolvimento: ovo, larva, pupa e mosca (Figura 5). Cada fêmea da mosca pode depositar 100 ovos por dia no período de até 20 dias (JENNINGS, 2011; LILLESAAR; GASPAR, 2018; PANCHAL; TIWARI, 2017). Apresentam um genoma simples, com quatro pares de cromossomos (ONG et al., 2015).

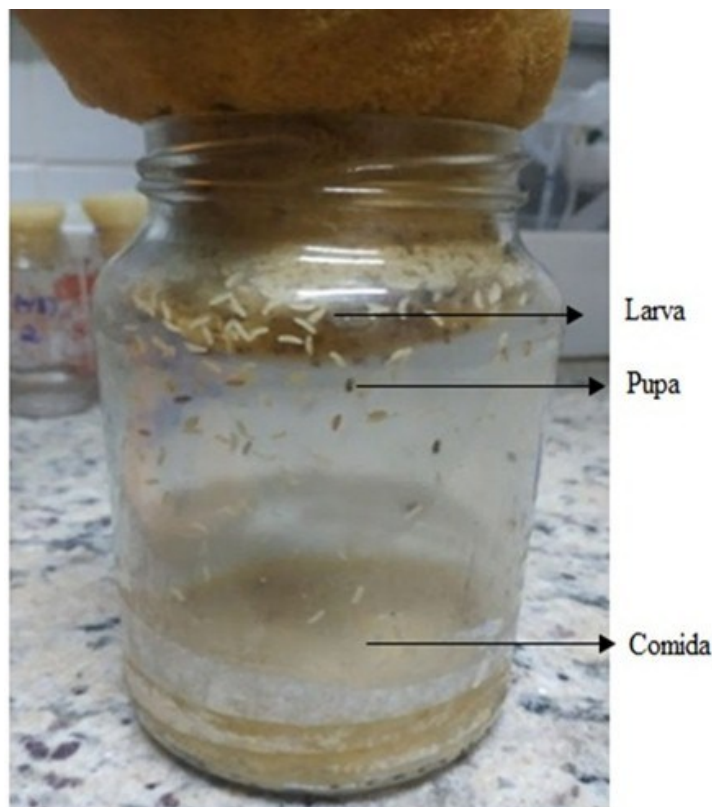
Figura 5: Ciclo de vida da *Drosophila melanogaster*.



Fonte: Ong et al. (2015)

As moscas *Drosophilas* apresentam características convenientes para serem utilizadas como organismo modelo em laboratórios de pesquisa, apresentam um ciclo de vida curto de 10 - 12 dias para alcançar a fase adulta, a manutenção em laboratório é fácil e com baixo custo, anatomia conhecida, manipulação genética rápida e simples. Além disso, devido à complexidade reduzida do genoma, os estudos voltados para perda de função são mais facilmente interpretados se comparadas ao ser humano, contribuindo para pesquisas na área de neurociência e biologia (JEIBMANN; PAULUS, 2009; MCGURK; BERSON; BONINI, 2015). Em laboratório são mantidas em recipientes contendo diferentes composições para a alimentação (Figura 6), sendo as mais utilizadas as de polpa de banana ou uma mistura de água, farinha de milho e fermento (JENNINGS, 2011).

Figura 6: Exemplo de como as moscas *Drosophila melanogaster* são mantidas em laboratório.



Fonte: Autoria própria (2021)

Esse inseto apresenta alta homologia com os genomas humanos, confirmando a sua importância para o estudo de doenças humanas. Estima-se que cerca de 75% dos genes humanos relacionados a doenças possuem ortólogos funcionais em *Drosophila*. Devido a isso, é utilizada como objeto de estudo para várias doenças neurodegenerativas como Alzheimer e Parkinson, e para o estudo de tumores (YAMAGUCHI; YOSHIDA, 2018).

Assim, esse organismo modelo tem sido empregado em uma série de estudos, facilitando o desenvolvimento científico na ecologia, comportamento, genética e biologia molecular, sendo uma ferramenta para o estudo toxicológico de compostos (DE AGUIAR et al., 2016).

Oboh et al. (2021) estudaram os extratos da folha da maçã do mato (*Heinsia crinita*) obtidos pela técnica de extração de solvente, sendo avaliados suas propriedades antioxidantes *in vitro* (AChE e TBARS) e *in vivo* com estudo de toxicidade para alumínio através do teste de sobrevivência em moscas *Drosophila melanogaster*. Os dados obtidos comprovaram a habilidade protetora do extrato da maçã do mato contra a toxicidade induzida por alumínio, tendo uma inibição da enzima AChE.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais

Os materiais e equipamentos que foram utilizados para a realização do presente trabalho estavam disponíveis nos laboratórios do PPGTA da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – Campo Mourão (UTFPR-CM), bem como na Central Analítica Multiusuário da UTFPR de Campo Mourão (CAMulti-CM).

Silimarina (pureza 95%, Sigma-Aldrich), Poloxamer 407 (pureza 71,5-74,9%, Sigma-Aldrich), surfactante Tween 80 P.S. (Dinâmica) foram utilizados na obtenção das nanopartículas. Brometo de potássio (KBr, grau espectroscópico, Sigma-Aldrich) foi utilizado nas análises de espectroscopia no infravermelho. Para as análises enzimáticas da AChE (*Electrophorus electricus*, E.C. 3.1.1.7 obtido de enguia, Sigma-Aldrich C3389-500UN) e BChE (E.C. 3.1.1.8 obtido de soro equino, Sigma-Aldrich C7512-1.2KU), foram utilizados Tris-HCl (Dinâmica), 5,5'-ditiobis (2-nitrobenzóico-DTNB) (Sigma-Aldrich), iodeto de acetiltiocolina (ASCh; Sigma-Aldrich A5751) e S-butiriltiocolina (BSCh; Sigma-Aldrich 20820). Fosfato de potássio monobásico e dibásico (99%, Dinâmica) foram utilizados para preparação do tampão fosfato de potássio (TFK). Para a realização dos meios de cultura para as moscas *Drosophila melanogaster*, foram utilizados ágar e nipagin e os outros reagentes utilizados (farinha de milho, fermento biológico, leite em pó, sacarose) foram adquiridos em comércio local.

4.2 Obtenção das nanopartículas

As nanopartículas foram obtidas pela técnica de dispersão sólida descritas por Almeida et al. (2018) com pequenas modificações. O polímero Kolliphor® Poloxamer 407 (0,90 g) e Tween 80 (0,009 g) foram solubilizados em etanol (37,5 mL) com auxílio de agitação magnética, e foi adicionado o bioativo (silimarina, 0,09 g). A solução foi submetida à sonicação (Fisher Scientific, 120 W, ponteira de 1/8” de diâmetro) por 3 minutos a 45 °C (pulsos de 30 segundos e 10 segundos de pausa). A dispersão obtida foi levada para evaporação em estufa com circulação e renovação de ar a 50 °C por aproximadamente 6 horas. As amostras foram armazenadas em freezer a -10 °C protegidas da luz.

4.3 Caracterização das nanopartículas

As análises de Calorimetria de Varredura Diferencial (DSC, Perkin Elmer 4000) foram realizadas a fim de investigar o comportamento térmico das amostras. Cerca de 5 a 10 mg do analito foram alocadas em porta-amostras de alumínio fechadas e aquecidas de 0 a 400 °C com taxa de 10 °C.min⁻¹ e fluxo de nitrogênio de 100 mL.min⁻¹.

A fim de investigar possíveis interações químicas entre os reagentes utilizados no processo de produção das nanopartículas de silimarina, foram realizadas análises de Espectrometria de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR, Shimizu Affinity-1). Foram medidos cerca de 2 mg de composto para produção de pastilhas de brometo de potássio (200 mg) e as análises foram conduzidas com resolução de 2 cm⁻¹ de 4000 a 400 cm⁻¹.

O valor do potencial zeta e o tamanho médio das nanopartículas foram realizadas pela técnica de Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS), sendo utilizado um analisador da marca Zetasizer Nano Series ZS modelo ZEN3600 do fabricante Malvern Instruments and PANalytical (Egham, Surrey, United Kingdom). Todas as amostras foram dispersas em uma solução de KCl (1 mM). A concentração final de cada amostra foi de 1 mg mL⁻¹. Para às análises no DLS e Potencial Zeta, foi realizada a diluição na proporção de 1:25 (v v⁻¹) para cada amostra, sendo o resultado média de três repetições. Além disso, as amostras foram colocadas em banho de ultrassom por 30 segundos. As análises de DLS foram realizadas utilizando o ângulo de 173°.

A Termogravimetria (TGA) foi realizada no equipamento da marca TA Instruments a uma taxa de aquecimento constante de 0,5 a 100 °C min⁻¹, em uma atmosfera inerte mantida com um fluxo de 100 mL min⁻¹ de nitrogênio, com um intervalo de temperatura de 25 a 450 °C.

Quando necessário, uma mistura física entre a silimarina e o encapsulante (Poloxamer 407) foi obtida pela simples mistura manual entre esses dois compostos na mesma proporção (10%) encontrada nas nanopartículas para comparação.

4.3.1 Medidas de estabilidade química

A fim de verificar a estabilidade química da formulação foram realizadas medidas de pH ao longo do tempo de acordo com De Melo et al. (2010). Foram avaliadas as suspensões em água de silimarina e das nanopartículas expostas a luz e armazenadas em frasco âmbar, uma vez que a alteração de pH pode indicar degradação dos compostos. As medidas dos valores de pH das suspensões foram realizadas semanalmente durante um período de 60 dias (8 semanas),

utilizando-se um potenciômetro (pHmetro GEHAKA PG2000) calibrado com soluções tampão padrão em pH 7,0 e 4,0.

4.3.2 Espectroscopia na região do UV-VIS

A silimarina e as nanopartículas contendo silimarina foram analisadas na região do UV-Vis por espectrofotômetro portátil (Ocean Optics Red Tide, USB650) de acordo com Meghreji et al. (2010), utilizando cubetas de quartzo com caminho óptico de 1 cm. Para a silimarina, foi preparada uma solução estoque de $24 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ em etanol e seguidas diluições (20, 18, 16, 14, 12, 10, 8 e $6 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) tiveram a sua absorvância na região de 190 a 1000 nm avaliadas. Para as nanopartículas contendo silimarina foi preparada uma solução estoque de $360 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ em etanol que foram diluídas para as concentrações finais de 180, 90, 45, 24 e $18 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.

4.4 Análises biológicas *in vivo*

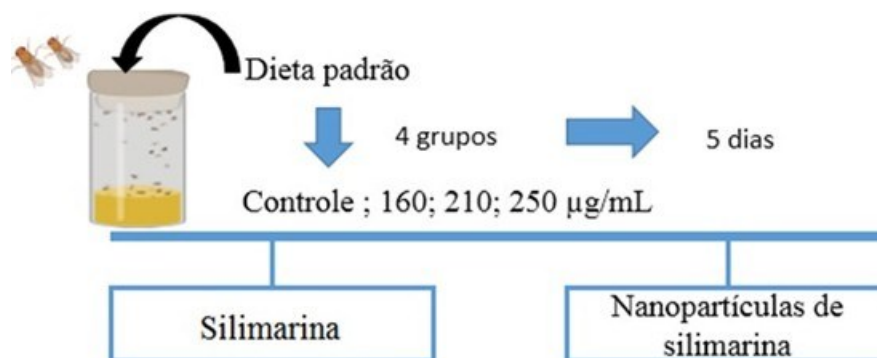
Foram utilizadas *Drosophila melanogaster* da linhagem Harwich, adultas e de ambos os gêneros, mantidas em frascos de vidro na incubadora BOD, sob condições controladas de luz (ciclo claro/escuro de 12 horas), temperatura ($24 \pm 1^\circ\text{C}$) e umidade (35 %), alimentadas com meio padrão (78,72% água; 21,0% de mistura) (96,2% de farinha de milho, 2% de sacarose, 1,6% de leite em pó, 0,2% de cloreto de sódio (NaCl); 0,05% metilparabeno); 0,23% álcool etílico, 0,05% metilparabeno e fermento biológico).

4.4.1 Teste de sobrevivência

Para a realização do teste de sobrevivência foram utilizadas moscas jovens (2-3 dias). Foi realizado a sincronização as moscas, neste procedimento os vidros contendo meio padrão e com maior número de larvas foram separados, todas as moscas vivas contidas no vidro foram removidas, sobrando apenas as larvas. Após a eclosão das larvas (2-3 dias) as moscas ficaram mantidas nos vidros por um período de 2 dias até tornarem-se adultas e então, iniciar os testes. No terceiro dia após a eclosão, as moscas foram adormecidas sob refrigeração e 100 moscas, (ambos o sexo) foram transferidas para meio de análise (1% de ágar; 1% de levedura; 0,05% de sacarose; 1% de leite em pó; 0,08% de metilparabeno) e cada uma contendo concentrações diferentes de nanopartículas de silimarina e controle (água ou etanol, 160; 210; $250 \mu\text{g}/\text{mL}$) e silimarina e controle (água ou etanol, 160; 210; $250 \mu\text{g}/\text{mL}$), como representado no esquema da Figura 7. A taxa de sobrevivência foi avaliada pela contagem diária do número de moscas vivas/mortas até o final do período experimental (5 dias) após a exposição às diferentes

concentrações do composto nanoencapsulado ou livre, sendo realizada um total de 5 repetições para o experimento.

Figura 7: Representação esquemática do experimento *in vivo* com *Drosophila melanogaster*, de ambos os sexos, utilizando a silimarina e as nanopartículas de silimarina nas concentrações controle, 160; 210; 250 $\mu\text{g/mL}$, para avaliar a taxa de sobrevivência em um período de 5 dias, com 5 repetições.



Fonte: Autoria própria (2022)

4.4 Análises *in vitro*

4.4.1 Atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE)

A atividade da AChE foi determinada de acordo com o método de Ellman et al. (1961) com adaptações. A mistura de ensaio contendo a enzima isolada, o tampão TFK 50 mM (pH 7,5) e o composto silimarina ou a nanopartículas de silimarina em diferentes concentrações foram pré-incubadas por 10 minutos à 25°C antes da adição do 5,5'-Dithiobis (ácido 2-nitrobenzóico) (DTNB) 2 mM e do substrato acetiltiocolina (ASCh – 8 mM) para iniciar a reação. As leituras foram feitas em intervalos de 1 minuto por 4 minutos. As absorvâncias foram detectadas a 405 nm no equipamento leitor de microplaca (Thermoplate Reader). A atividade enzimática foi expressa em porcentagem (%) em relação ao controle (água e etanol). Esta análise foi realizada para a silimarina (160; 180; 210; 250 $\mu\text{g/mL}$), nanopartículas de silimarina (180; 210; 250; 300; 350 $\mu\text{g/mL}$) e para o poloxamer 407 (350 $\mu\text{g/mL}$).

4.4.2 Atividade da enzima butirilcolinesterase (BChE)

A atividade da BChE foi determinada de acordo com o método de Ellman et al. (1961) com modificações. A mistura de ensaio contendo a enzima isolada, o tampão TFK 50 mM (pH 7,5) e o composto em diferentes concentrações foram pré-incubadas por 10 minutos à 25°C antes da adição do 5,5'-Dithiobis (ácido 2-nitrobenzóico) (DTNB) 2 mM e iodeto de butiriltiocolina (BSCh – 8 mM) ser adicionado para iniciar a reação. As leituras serão feitas em

intervalos de 1 minuto por 4 minutos. As absorbâncias foram detectadas a 405 nm no equipamento leitor de microplaca (Thermoplate Reader). A atividade enzimática foi expressa em porcentagem (%) em relação ao controle (água e etanol). Esta análise foi realizada para a silimarina (150; 180; 210; 250 µg/mL), nanopartículas de silimarina (180; 210; 250; 300; 350 µg/mL) e para o polímero poloxamer 407 (350 µg/mL).

4.5 Ensaio *ex vivo*

4.5.1 Preparação do homogeneizado

Foram separadas 80 moscas (obtidas após o 5º dia do teste de sobrevivência) por grupo sendo essas sensibilizadas em refrigerador doméstico (4°C) e homogeneizadas manualmente em Tris-HCl (50 mM, pH 7,0) (1:10 mosca/µL tampão), centrifugadas a 10.000 rpm por 10 minutos e recolhida uma alíquota de sobrenadante (S₁) de cada grupo e armazenada em freezer para posteriores realizações das análises. Esta análise foi realizada em moscas suplementadas com controle (água ou etanol), nanopartículas de silimarina ou silimarina nas concentrações 160; 210; 250 µg/mL).

4.5.2 Atividade da acetilcolinesterase (AChE) e butirilcolinesterase (BChE)

A atividade da AChE e BChE das moscas *Drosophila melanogaster* foram determinadas de acordo com o método de Ellman et al. (1961) com modificações. O meio da reação foi adicionado do tampão TFK 50 mM (pH 7,5), 5,5'-Dithiobis (ácido 2-nitrobenzóico) (DTNB) 2 mM e a solução de sobrenadante (S₁). Foi adicionado o substrato acetiltiocolina ou butiriltiocolina ao meio contendo o S₁. A atividade da AChE ou BChE foi medida através do aumento da absorbância em leitor de placa (Thermo-Plate Reader) em comprimento de onda de 405 nm, com leituras a cada minuto durante 4 minutos. Esta atividade foi expressa em % do controle.

4.6 Consumo alimentar

O consumo alimentar foi avaliado de acordo com Lushchak et al. (2011), com modificações. Um grupo de 100 moscas foram expostas a alimentação suplementada com o composto e as nanopartículas nas concentrações de 160, 210 e 250 µg/mL por 5 dias, no último dia um grupo de 15 moscas foram separadas e adicionadas em frascos para jejuarem por 30 minutos. Após o jejum as moscas foram expostas a alimentação com 1% de ágar; 1% de levedura; 0,05% de sacarose; 1% de leite em pó; 0,08% de metilparabeno e com a adição de

0,5 % do corante Brilliant Blue FCF (Sigma- Aldrich) e permaneceram nesse meio por 2 horas. Após o período de alimentação, cada grupo de moscas foi imediatamente congelado em freezer. As 15 moscas de cada grupo foram homogeneizadas em 200 μ L de Tris-HCl (50 mM, pH 7,0) e posteriormente centrifugadas a 12000 rpm por 15 minutos, sendo retirado o sobrenadante (S₁). O sobrenadante (S₁) foi medido em um leitor de microplacas de 96 poços a 630 nm, com a utilização de 150 μ L de TFK (pH 7,5) e 50 μ L do S₁, os resultados foram expressos em porcentagem em comparação com o grupo controle.

4.7 Análise estatística

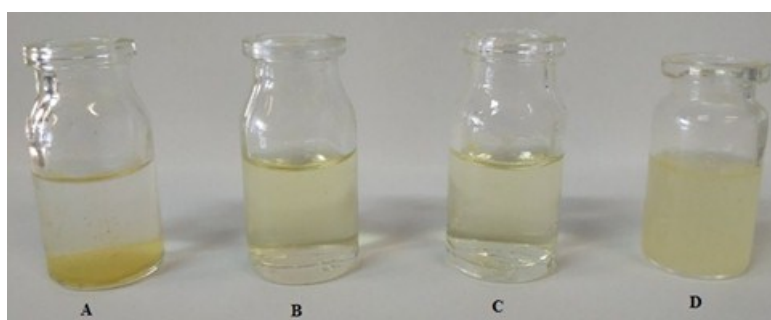
As análises estatísticas foram realizadas no software GraphPad Prism versão 8.0, utilizando ANOVA de uma via ao nível com teste post hoc de Tukey, a um nível de significância de 5%. Os dados foram expressos em média \pm erro padrão.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização das nanopartículas

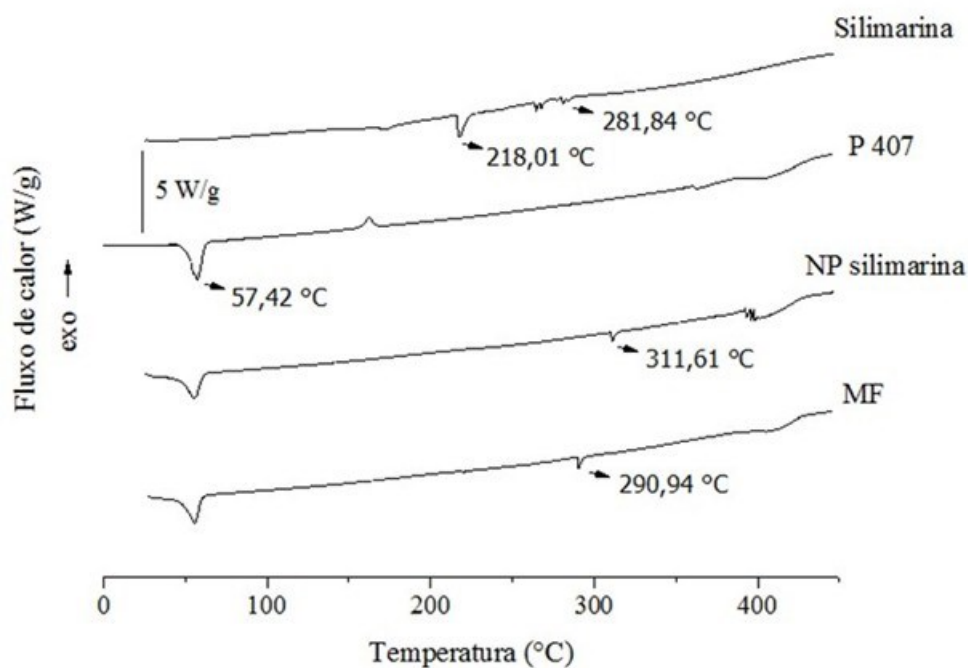
A Figura 8 apresenta as nanopartículas de silimarina e a silimarina dispersas em água e etanol, nas concentrações de 1 mg/mL para a silimarina e de 10 mg/mL para as nanopartículas. A Figura 9 apresenta os termogramas obtidos por Calorimetria Diferencial de Varredura das nanopartículas de silimarina (NP), P407, mistura física (MF) e silimarina.

Figura 8: Silimarina dispersa em água (A), silimarina em etanol (B), nanopartículas em água (C), nanopartículas em etanol (D).



Fonte: Autoria própria (2021)

Figura 9: Termogramas obtidos por DSC da silimarina, silimarina nanoencapsulada (NP), polímero P407 e da mistura física (MF).



Fonte: Autoria própria (2022)

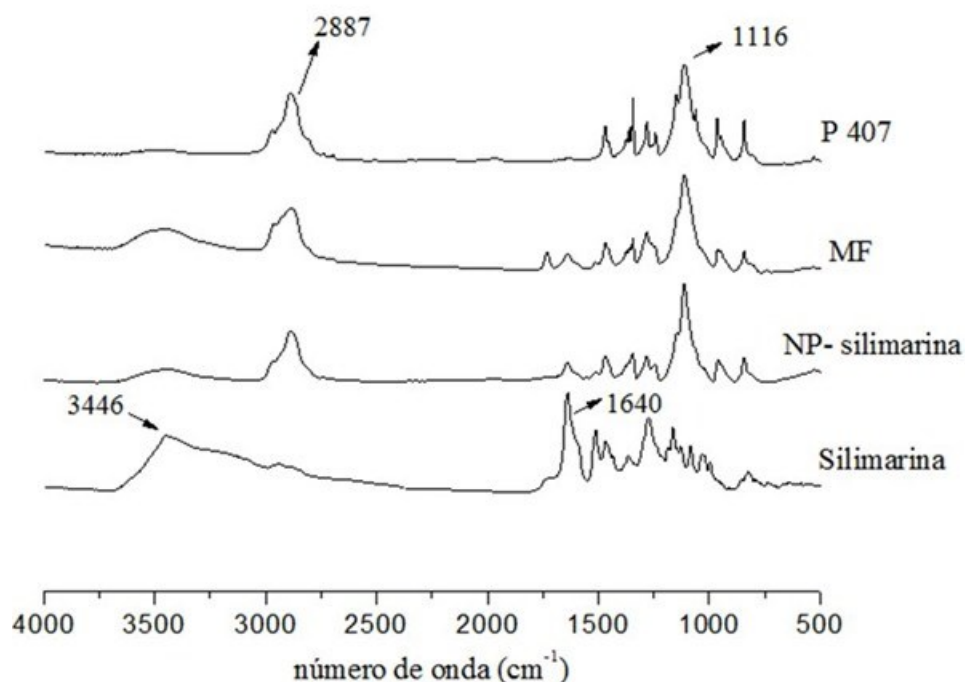
Nas dispersões da Figura 8, em uma análise qualitativa pode-se observar que ocorre um aumento da solubilidade da silimarina. Quando dispersas em água as nanopartículas (8-C) se assemelham ao da silimarina em etanol (8-B). Pode-se notar que a silimarina é solúvel em etanol, mas quando dispersa em água tende a precipitar (8-A).

Nos termogramas apresentados da Figura 9 é possível identificar o pico da temperatura de fusão (T_f) da silimarina em $218,01^\circ\text{C}$ e em $281,84^\circ\text{C}$, próximo ao encontrado na literatura de $257,38^\circ\text{C}$ (KUMAR et al., 2014). O pico endotérmico de fusão do polímero P407 foi encontrado em $57,42^\circ\text{C}$, também próximo ao encontrado na literatura de $57,13^\circ\text{C}$ (HURLEY et al., 2020)(HURLEY et al., 2020). Na mistura física o pico de fusão da silimarina aparece em $290,94^\circ\text{C}$, enquanto nas nanopartículas esse pico apresenta-se deslocado em $311,61^\circ\text{C}$, sendo um indício que pode ter ocorrido uma interação entre o encapsulante, o polímero Poloxamer, e o composto silimarina, indicando que houve a encapsulação do composto na matriz polimérica.

Em trabalho realizado por Sonali et al. (2010), dispersões sólidas de silimarina utilizando como encapsulante o polímero hidrofílico hidroxipropilmetilcelulose (HPMC) foram avaliadas quanto a análise térmica de DSC, sendo visto que todos os espectros da dispersão sólida demonstraram mudanças em relação aos originais, sendo justificado como uma possível interação entre os compostos do polímero e a porção polifenólica do composto silimarina.

A Figura 10 apresenta os espectros no infravermelho (FTIR) da silimarina, do polímero P407, da mistura física e das nanopartículas contendo silimarina.

Figura 10: Espectros no infravermelho (FTIR) do polímero P407, da mistura física (MF), das nanopartículas de silimarina (NP's) e da silimarina.



Fonte: Autoria própria (2021)

De acordo com os espectros FTIR da silimarina, pode-se observar picos em 3346 cm⁻¹ correspondentes às vibrações fenólicas (-OH), além disso, bandas de absorção em 1640 cm⁻¹ referentes ao alongamento C=O (SNIMA et al., 2014).

No espectro de absorção do P407 foi possível identificar uma banda bem definida em 2887 cm⁻¹ referente ao grupo C-H alifático e a banda presente em 1116 cm⁻¹ confirma a presença de ligações C-O característicos de grupamento éter (VYAS et al., 2009).

A faixa de absorção referente a ligação C=O presente na silimarina foi atenuada na mistura física e nas nanopartículas de silimarina. De acordo com Leimann et al. (2015), a presença de deslocamentos ou mudanças no espectro polímero-composto é uma indicação de que estes estão interagindo quimicamente, confirmando que o composto foi nanoencapsulado na matriz polimérica.

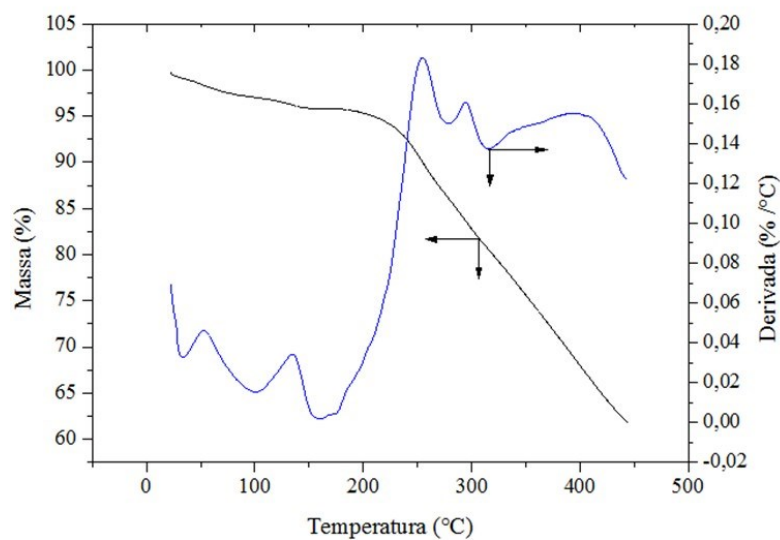
O Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS) é uma técnica amplamente utilizada para encontrar o tamanho das nanopartículas, e atua medindo a dispersão da luz em função do tempo (MOURDIKOU DIS; PALLARES; THANH, 2018). Os valores para o tamanho médio das nanopartículas e para o índice de polidispersão (PDI), foram de 246 ± 27 nm e 0,54 ± 0,18 respectivamente. O PDI é um parâmetro adimensional, que varia de 0 a 1, conforme esse valor se aproxima de zero a distribuição de tamanho das nanopartículas torna-se mais homogênea (KHAYATA et al., 2012).

O potencial zeta encontrado para a nanopartículas de silimarina foi de $-10,83 \pm 0,15$ mV. O potencial zeta designa o potencial eletrocinético em sistemas coloidais, e expressa a diferença de potencial entre o meio de dispersão e a camada estacionária do fluido ligado à partícula dispersa, ou seja, é um parâmetro que expressa o equilíbrio eletroquímico entre partículas e líquidos em soluções coloidais (HONARY; ZAHIR, 2013; LUNARDI et al., 2021). Em trabalho realizado por Singh et al. (2020), a silimarina juntamente com monoleato de glicerina foram nanoencapsulados em Poloxamer 407 pela técnica de emulsificação com a utilização de sonicação, foram realizadas análises de DLS e potencial zeta para caracterização das nanoemulsões. Obtiveram como resultados um valor para o tamanho médio de 184 ± 4 nm, para o índice de dispersão de $0,384 \pm 0,014$ e para o potencial zeta de $-11,3 \pm 1,7$ mV. O potencial zeta carregado negativamente pode ser atribuído a adsorção dos íons OH^- durante a formação das nanopartículas.

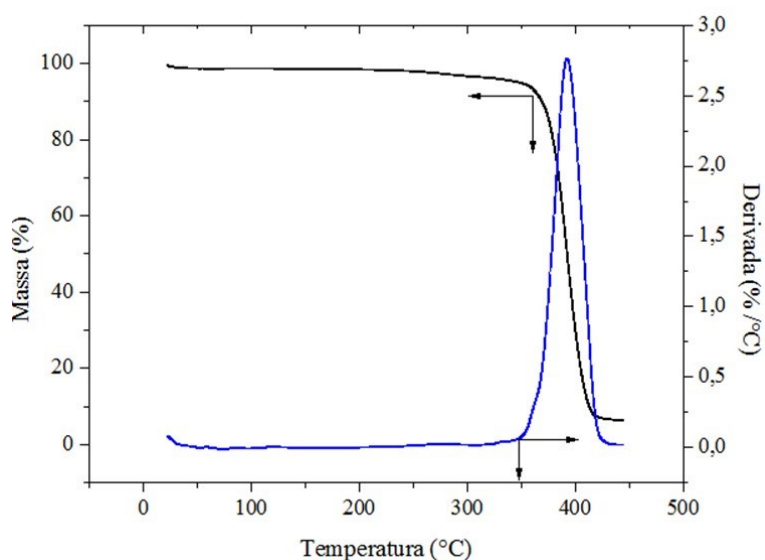
5.1.1 Análise termogravimétrica (TGA)

A Figura 11 mostra a estabilidade térmica das nanopartículas avaliada via TGA e as respectivas curvas derivadas (DTGA) submetidas a temperaturas na faixa de 25 a 450°C.

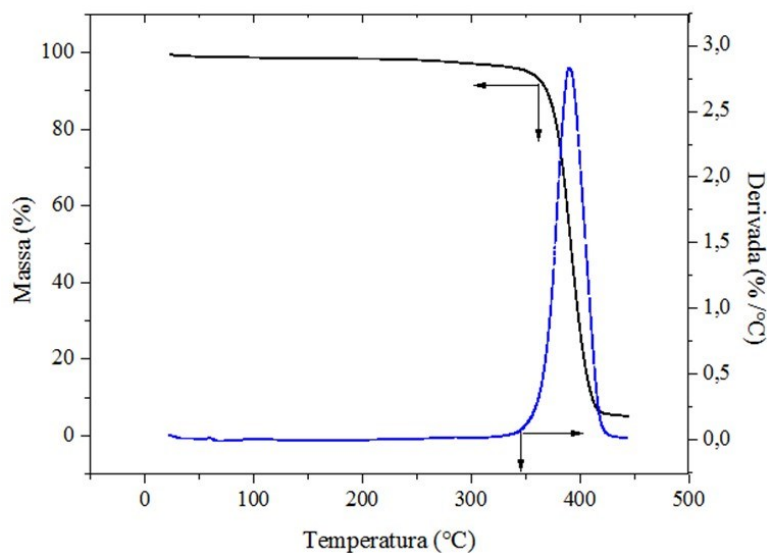
Figura 11: Curvas TGA-DTGA: (A) silimarina, (B) nanopartículas de silimarina (NP) e (C) mistura física (MF).



(A) Silimarina



(B) Nanopartículas de silimarina



(C) Mistura física

Fonte: Autoria própria (2022)

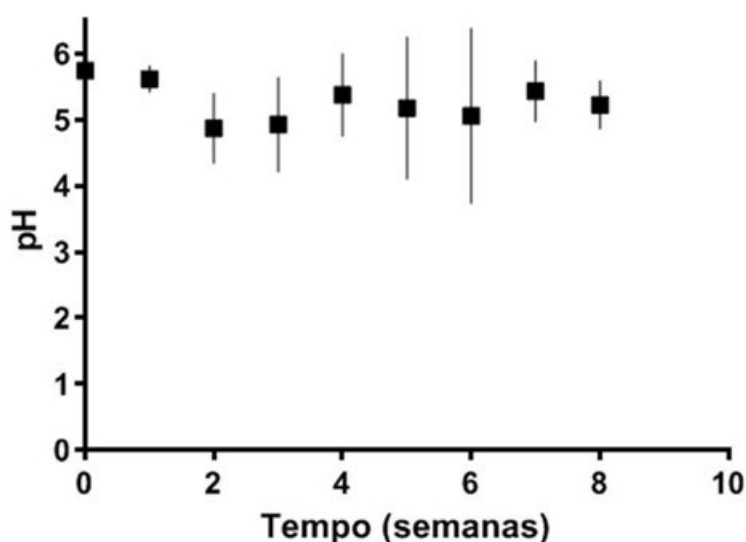
Nas curvas de TGA apresentadas na Figura 11, observa-se que a silimarina (A) é termicamente estável até a temperatura de aproximadamente 230 °C, em que teve um início de perda de massa, tendo ao final uma perda de massa de aproximadamente 40 %. Quando se analisa as curvas TGA e a variação da perda de massa em função da temperatura, as curvas derivadas (DTGA), das nanopartículas (B) e da mistura física (silimarina e Poloxamer 407) (C) pode-se notar que se assemelham, sendo observada uma única perda de massa na curva TGA-DTGA de aproximadamente 95%.

Em trabalho realizado por Snima et al. (2014), a silimarina foi encapsulada através da técnica de emulsão, utilizando como encapsulante o polímero poli(ácido lático-co-ácido glicólico) (PLGA). Através da análise de TGA, obtiveram como resultados que tanto as nanopartículas contendo silimarina quanto as nanopartículas apenas com o polímero apresentaram degradação em torno de 250 °C, indicando que a encapsulação da silimarina não alterou as propriedades de degradação do polímero.

5.1.2 Medidas de estabilidade química

A fim de observar a estabilidade química das nanopartículas ao longo do tempo, foi acompanhado o valor de pH das dispersões de silimarina em água (Figura 12).

Figura 12: Variação de pH da formulação de nanopartículas de P407 com silimarina no período compreendido entre zero a oito semanas de armazenamento em temperatura ambiente em frasco âmbar (n=2).



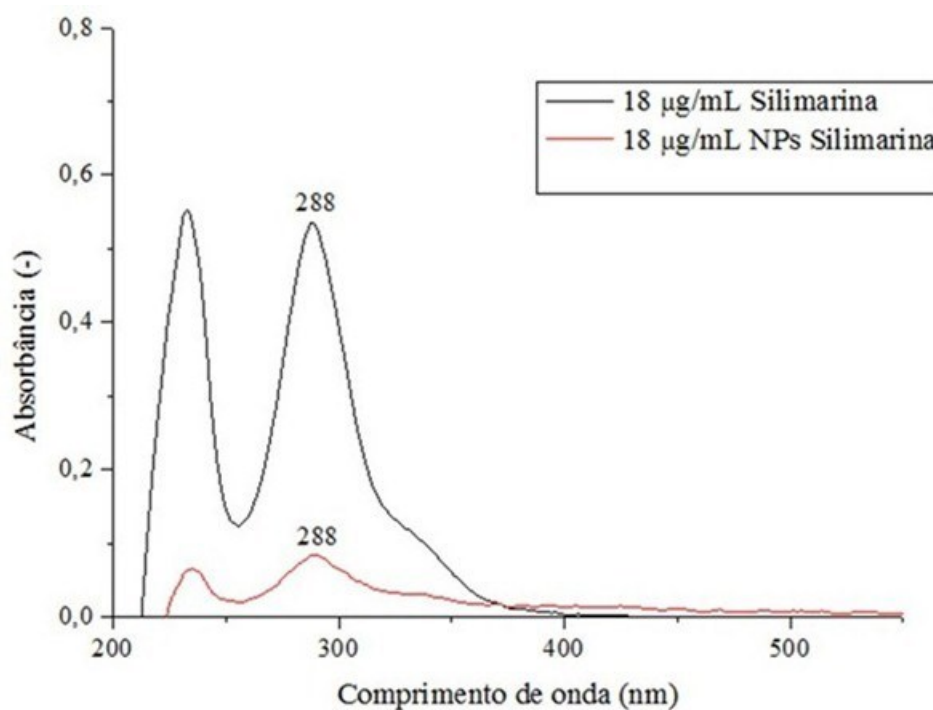
Fonte: Autoria própria (2021)

O pH está relacionado a carga eletrostática na superfície das partículas, sendo um parâmetro chave na determinação da estabilidade coloidal da dispersão das nanopartículas (SOLANGI et al., 2015). Segundo Melo et al. (2010), a realização desta análise é um indicativo da estabilidade química dos compostos presentes nas nanopartículas, pois a alteração de pH pode indicar a degradação de alguns destes no decorrer do tempo (KÜLKAMP et al., 2009). Pode-se observar que o valor de pH inicial para as nanopartículas de silimarina armazenadas em frasco âmbar no tempo zero foi de 5,74 e se manteve estável, sendo este um indício de que o composto se mantém encapsulado.

5.1.3 Espectroscopia na região do UV-VIS

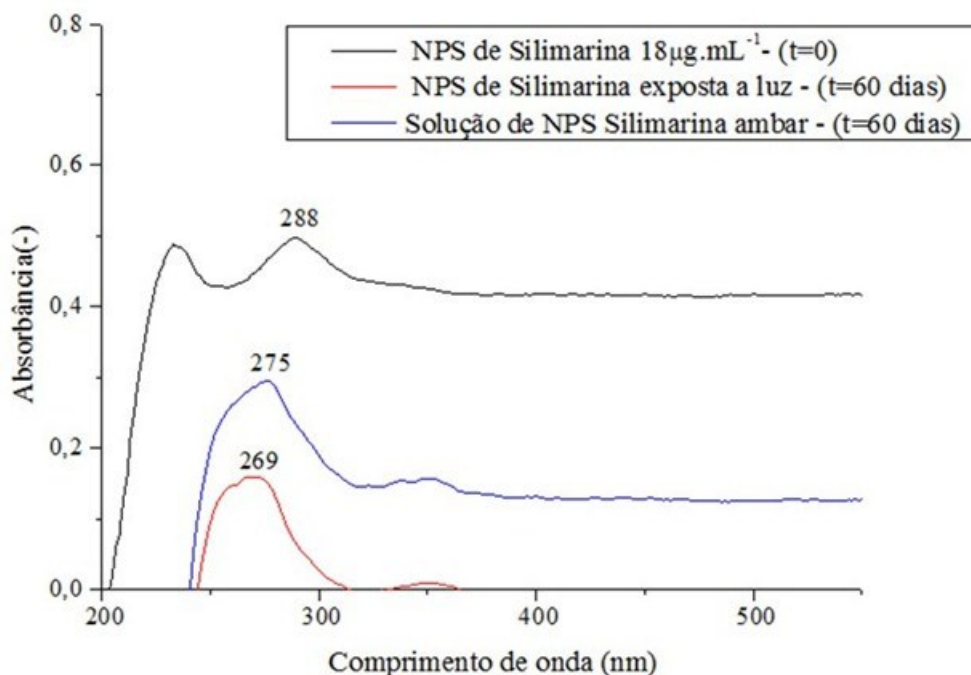
A Figura 13 mostra o espectro de UV-VIS da silimarina e das nanopartículas de silimarina, ambos em etanol. A Figura 14 apresenta os espectros de absorção da formulação de nanopartículas de silimarina expostas e reservadas da luz por 60 dias.

Figura 13: Espectro de UV-VIS da silimarina e nanopartículas de silimarina (NPs,) ambos em etanol nas concentrações de 18 $\mu\text{g/mL}$.



Fonte: Autoria própria (2021)

Figura 14: Sobreposição dos espectros de UV-VIS das nanopartículas (NPs) expostas e reservadas da luz por 60 dias, para a concentração de 18 $\mu\text{g}/\text{mL}$.



Fonte: Autoria própria (2021)

O UV-Vis é uma técnica que mede a intensidade da luz refletida a partir de uma amostra, e a compara com a intensidade de luz refletida por um material de referência, sendo uma ferramenta importante para identificar, caracterizar e investigar esses materiais, e avaliar a estabilidade de nanopartículas (MOURDIKOUDIS; PALLARES; THANH, 2018).

No espectro de absorção da Figura 13, verifica-se que a absorção máxima da silimarina e das nanopartículas ocorreu em 288 nm para a concentração de 18 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Em trabalho realizado por Meghreji et al. (2010), para as concentrações de 6-16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de silimarina solubilizada em etanol, foi encontrada uma absorção máxima de 287 nm.

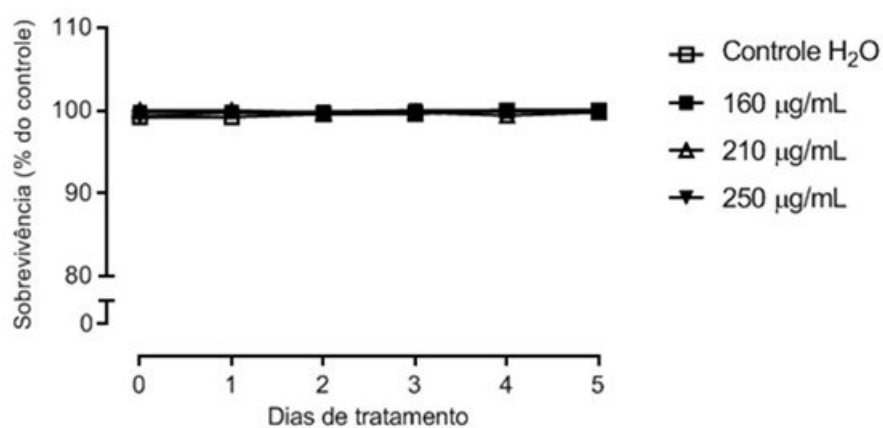
Na Figura 14, comparando-se o espectro de absorção para a concentração de 18 $\mu\text{g}/\text{mL}$ das nanopartículas de silimarina em tempo zero, após 60 dias (8 semanas) expostas a luz e em frasco âmbar, pode se observar que houve absorção máxima em 288 nm para as nanopartículas e após 60 dias houve a diminuição para 275 nm (frasco âmbar) e 268 nm (exposta a luz).

5.2 Ensaio *in vivo*

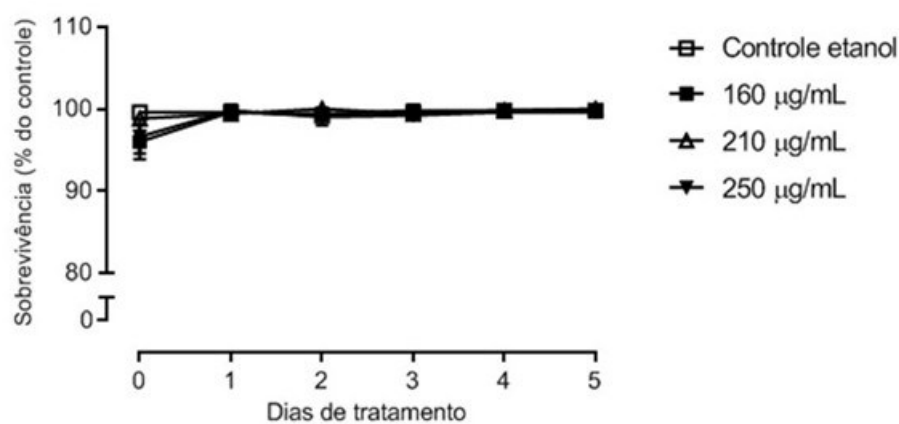
5.2.1 Teste de sobrevivência

O teste de sobrevivência foi realizado em *Drosophila melanogaster*, em que a silimarina e as nanopartículas de silimarina foram adicionadas a dieta padrão das moscas, durante um período de cinco dias em diferentes concentrações finais (controle, 160, 210, 250 $\mu\text{g/mL}$).

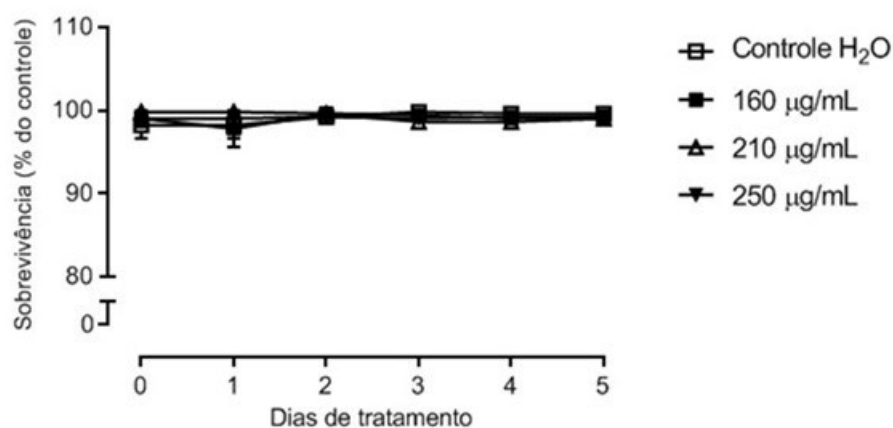
Figura 15: Curva de sobrevivência de *Drosophila melanogaster* com a dieta suplementada com A) silimarina em água, B) silimarina em etanol, C) nanopartículas em água, D) nanopartículas em etanol, nas concentrações de 160, 210 e 250 $\mu\text{g/mL}$. Os dados são apresentados como a média \pm erro padrão. Cada ensaio foi realizado em cinco experiências independentes. O grupo controle recebeu dieta suplementada com água ou etanol.



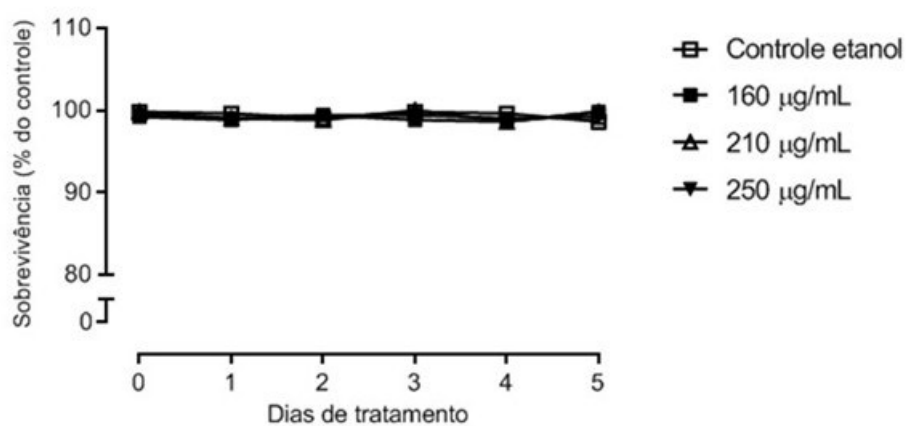
A) Silimarina em água



B) Silimarina em etanol



C) Nanopartículas em água



D) Nanopartículas em etanol

Fonte: Autoria própria (2021)

O método mais direto para avaliar a toxicidade de compostos no modelo *Drosophila* é através da determinação da sobrevivência após a exposição ao composto, sendo uma possível rota de exposição a ingestão. Por exemplo, os compostos podem ser adicionados diretamente no alimento padrão da mosca em várias concentrações (ONG et al., 2015). Além disso, a *Drosophila* apresenta um intestino altamente sensível quanto à dieta, influenciando em fatores como taxa de eclosão, expectativa de vida, reprodução e atividade locomotora, devido a isso torna-se um modelo ideal para a pesquisa na área de alimentos (LI et al., 2020).

Os dados da Figura 15 mostram que as moscas que foram mantidas em frascos contendo a dieta suplementada com silimarina dispersa em água e etanol, além das nanopartículas em água e etanol. Pode-se observar nos dados da Figura 15, que para todos os ensaios testados e em todas as concentrações, não resultou em alterações significativas na mortalidade das moscas quando comparadas ao grupo controle (água ou etanol). No presente estudo, a adição das nanopartículas de silimarina (Figura 15-C) na dieta padrão das moscas não ocasionou em perda

da bioatividade do composto no processo de encapsulação, apenas um aumento da solubilidade em água.

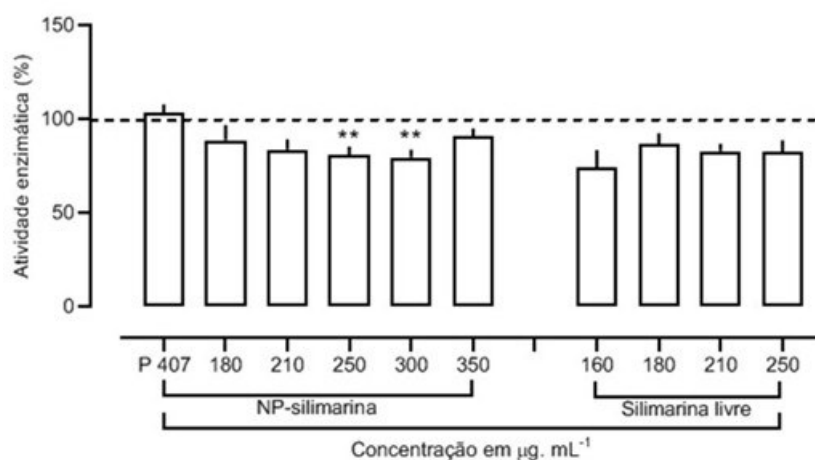
Em estudo realizado por Kumar et al. (2015), foi testada a eficácia da silimarina como composto com potencial ação antienvhecimento usando o verme *Caenorhabditis elegans* como modelo biológico, tendo a dieta com e sem a adição da silimarina, nas concentrações de 25 μM , 50 μM e 100 μM a 16 °C por 36 horas. Os resultados mostraram que a silimarina aumentou o tempo médio de vida do organismo modelo, quando este teve a dieta suplementada com o composto, em comparação com o grupo controle (sem a silimarina), apresentando na concentração de 100 μM efeitos tóxicos e resultando na redução da vida útil do *Caenorhabditis elegans*.

5.3 Ensaios *in vitro* e *ex vivo*

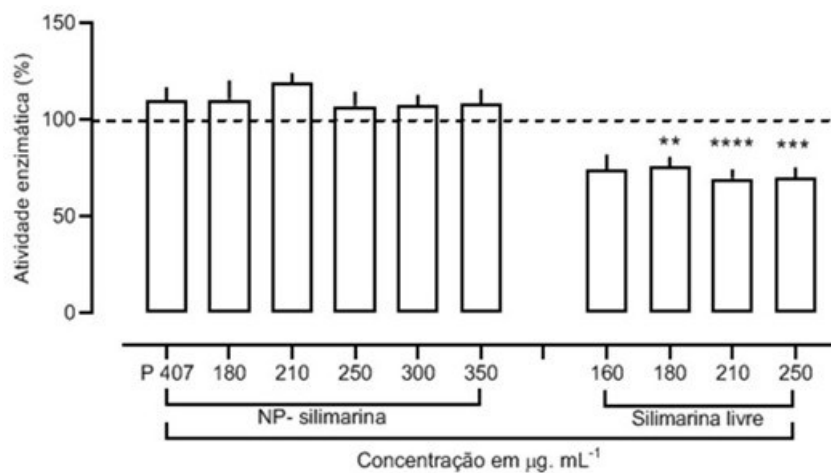
5.3.1 Atividade das enzimas acetilcolinesterase e butirilcolinesterase

As Figuras 16 e 17 (A, B) demonstram as atividades *in vitro* da AChE e BChE analisadas nas concentrações de nanopartículas de silimarina de 180 a 350 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e silimarina de 150 a 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$, dispersas em água e etanol. A eficácia de inibição foi expressa em porcentagem da atividade da enzima inibida em comparação com o valor do controle (água e etanol).

Figura 16: Porcentagem de atividade *in vitro* da enzima AChE frente as NP-silimarina e silimarina, solubilizadas em água (A) e em etanol (B). Valores expressos em média \pm erro (n=5 por grupo). A linha tracejada representa o valor do grupo controle. Significância determinada pela análise de variância unidirecional (ANOVA) seguida do teste de Tukey (** p <0,01; *** p <0,001; **** p <0,0001 em comparação ao controle água e etanol).



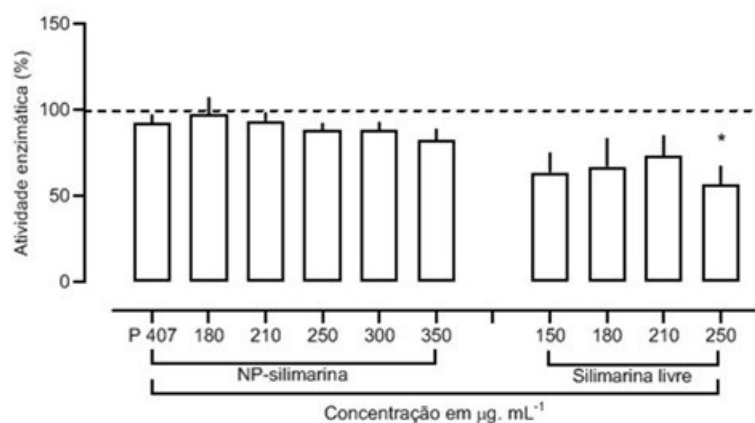
(A) Solubilizado em água



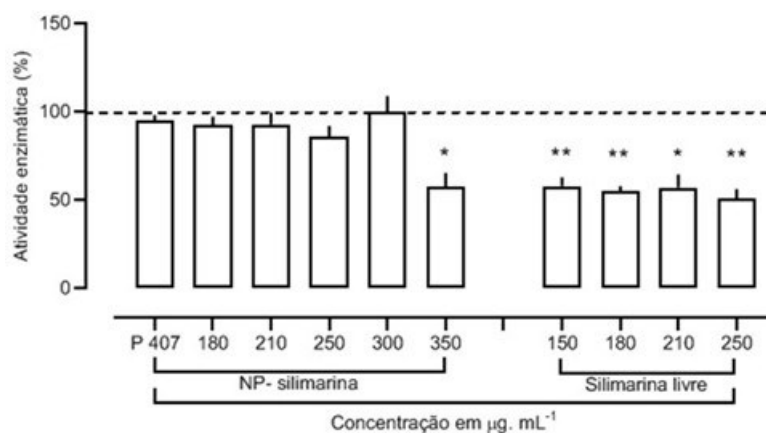
(B) Solubilizado em etanol

Fonte: Autoria própria (2021)

Figura 17: Porcentagem de atividade in vitro da enzima BChE frente as NP-silimarina e silimarina, solubilizadas em água (A) e em etanol (B). Valores expressos em média \pm erro (n=5 por grupo). A linha tracejada representa o valor do grupo controle. Significância determinada pela análise de variância unidirecional (ANOVA) seguida do teste de Tukey (* p < 0,05; ** p < 0,01 em comparação ao controle água e etanol).



(A) Solubilizado em água



(B) Solubilizado em etanol

Fonte: Autoria própria (2021)

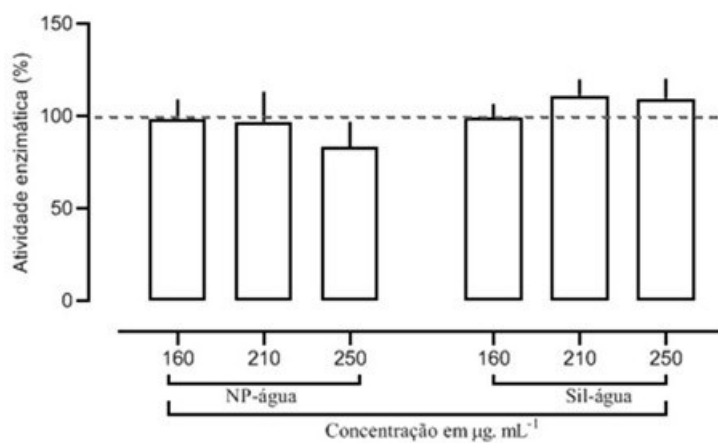
Os dados da Figura 16-A mostram que quando dispersada em água, a silimarina não influenciou significativamente a atividade da AChE nas concentrações de 160 a 250 µg/mL quando comparada ao controle. A atividade da BChE (Figura 17-A) para a silimarina dispersa em água, apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) para a concentração de 250 µg/mL em relação ao grupo controle.

As nanopartículas de silimarina nas concentrações de 250 e 300 µg/mL inibiram significativamente a atividade *in vitro* da enzima AChE ($p < 0,01$), apresentando valores de 80,91 e 79,93 % respectivamente em comparação com o grupo controle, mostrando que a encapsulação potencializou a ação inibitória do composto, quando comparado a silimarina nas mesmas concentrações (Figura 16). Para o mesmo ensaio com as nanopartículas dispersas em água não houve diferença significativa da atividade *in vitro* da BChE em relação ao controle. Por fim, o polímero Poloxamer 407 não alterou significativamente a atividade da AChE e BChE, o que confirma que a inibição causada pelas nanopartículas foi decorrente somente do composto nanoencapsulado e não do material encapsulante, sendo assim, o polímero não apresentou o efeito *per se*.

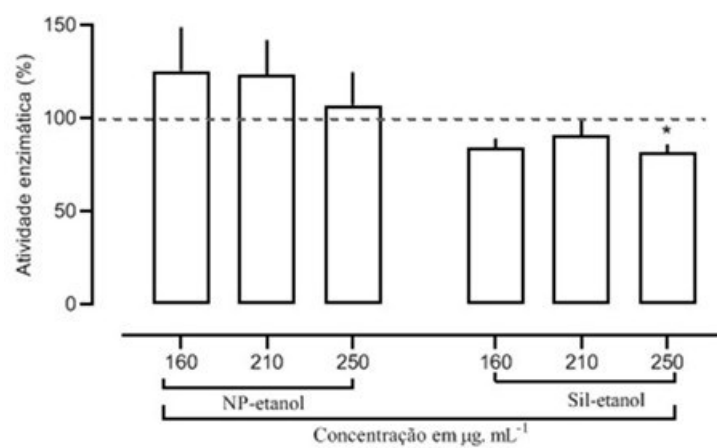
Percebe-se, que a silimarina solubilizada em etanol (Figura 16-B) iniciou a inibição a partir da concentração 180 µg/mL, com um valor de atividade enzimática de 76,06 %. Além disso, a solubilização da silimarina em etanol diminuiu significativamente ($p < 0,0001$) a atividade *in vitro* da enzima AChE na concentração de 210 µg/mL (69,84 %) e a 250 µg/mL (70,37 %) ($p < 0,001$), quando comparada com o grupo controle (somente etanol). Para o mesmo ensaio com as NP- silimarina não houve diferença significativa da atividade *in vitro* da AChE em relação ao controle. Para a BChE (Figura 17-B) a silimarina solubilizada em etanol diminuiu significativamente a atividade enzimática em todas as concentrações, enquanto que para as nanopartículas apresentou resultado significativo apenas na concentração de 350 µg/mL, apresentando uma atividade enzimática de 57,88%.

As Figuras 18 e 19 (A, B) mostram os resultados da atividade *ex vivo* da AChE e BChE no tecido de *Drosophila melanogaster* para as nanopartículas e para a silimarina, dispersos em água e etanol. A eficácia de inibição foi expressa em porcentagem da atividade da enzima inibida em comparação com o valor do controle (água e etanol).

Figura 18: Efeitos das nanopartículas de silimarina e silimarina sobre a atividade *ex vivo* da AChE no tecido de *Drosophila melanogaster*, em A) água e B) etanol. Valores expressos em média \pm SEM ($n = 5$ por grupo). A linha tracejada representa o valor do grupo controle. Significância determinada pela análise de variância unidirecional (ANOVA) seguida do teste de Tukey (* $p < 0,05$).



(A) Solubilizado em água

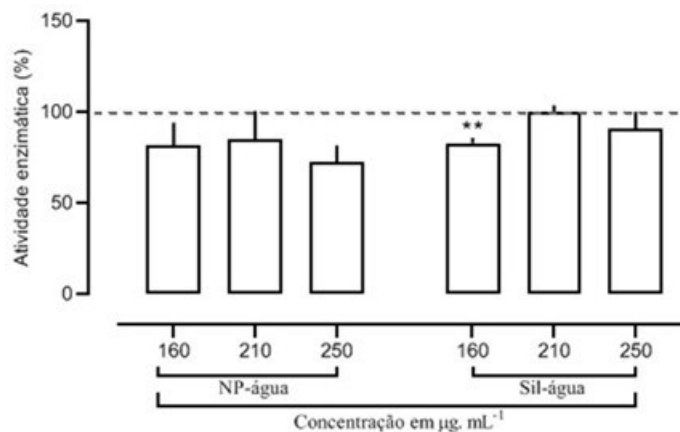


(B) Solubilizado em etanol

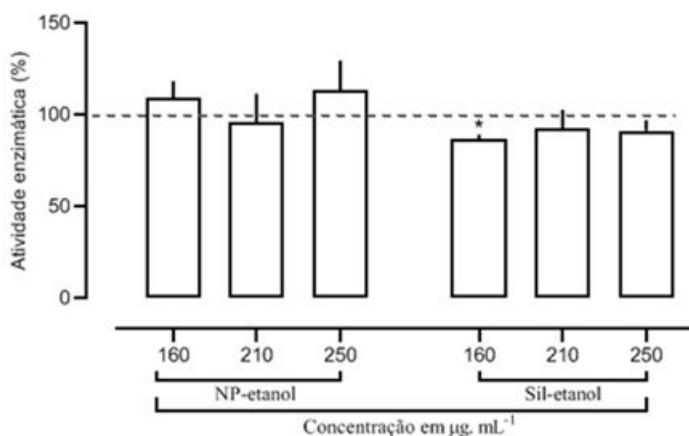
Fonte: Autoria própria (2021)

Figura 19: Efeitos das nanopartículas de silimarina e silimarina sobre a atividade *ex vivo* da BChE no tecido de *Drosophila melanogaster*, em A) água e B) etanol. Valores expressos em média \pm SEM (n = 5 por grupo). A

linha tracejada representa o valor do grupo controle. Significância determinada pela análise de variância unidirecional (ANOVA) seguida do teste de Tukey (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$).



(A) Solubilizado em água



(B) Solubilizado em etanol

Fonte: Autoria própria (2021)

Os efeitos da silimarina e nanoencapsulada sobre a ação *ex vivo* nas enzimas colinérgicas avaliados em *Drosophila melanogaster* estão mostrados na Figura 18 para a AChE e Figura 19 para a BChE. Pode-se observar na Figura 18-A que a atividade da AChE não foi inibida de forma significativa para as nanopartículas e para silimarina, ambas dispersas em água. Para a silimarina solubilizada em etanol (18-B), a atividade da enzima foi inibida significativamente ($p < 0,05$) apenas para a concentração de 250 µg/mL, tendo a atividade enzimática de 81,70%.

Em relação a BChE, houve inibição significativa ($p < 0,01$) em relação ao controle água (Figura 19-A) e em relação ao controle etanol ($p < 0,05$) (Figura 19-B), ambos na concentração de 160 µg/mL de silimarina, com valores de atividade enzimática de 83,27% e 86,98%, respectivamente.

Em pesquisa realizada por El-Marasy; Abd-Elsalam; Ahmed-Farid (2018) foi estudado o possível efeito benéfico da silimarina na demência induzida por escopolamina em ratos, sendo a atividade da acetilcolinesterase determinada para o homogeneizado do córtex e hipocampo dos animais. O estudo mostrou que os ratos que receberam um pré-tratamento com o composto nas doses de 200, 400 e 800 mg/kg diminuíram significativamente a atividade da AChE para 75,83, 52,36, 50,74%, respectivamente para o tecido cortical, enquanto para o hipocampo apresentaram valores de 52,94, 43,20, 35,21% em comparação com o grupo controle (escopolamina).

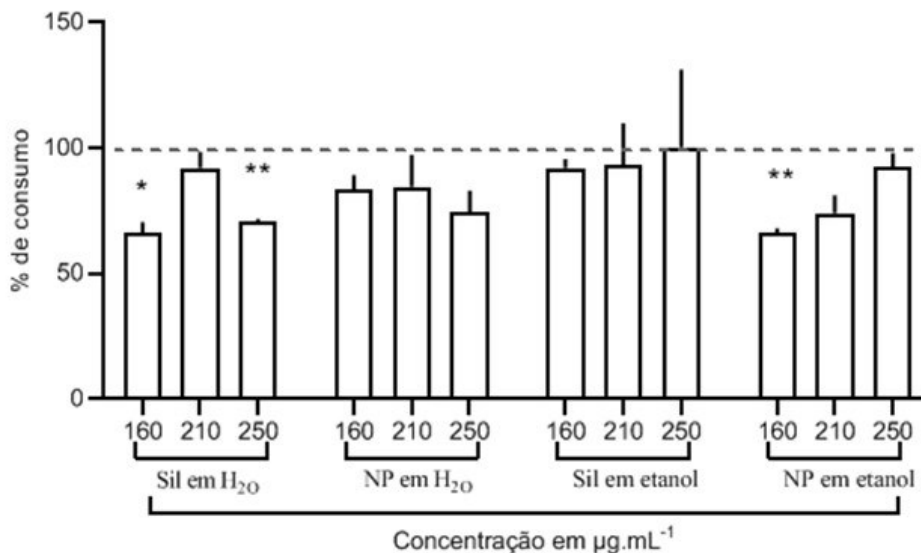
De acordo com a hipótese colinérgica, doenças neurodegenerativas, seriam causadas pela redução da síntese do neurotransmissor acetilcolina e aumento da atuação da enzima AChE no cérebro (SHARMA, 2019). O neurotransmissor acetilcolina desempenha no sistema colinérgico um papel fundamental na modulação das funções colinérgicas, como aprendizagem, memória e nas atividades locomotoras (AKINYEMI et al., 2018). Estudos demonstram que a silimarina pode ser utilizada para tratar a Doença de Alzheimer, aumentando a energia colinérgica, fornecendo proteção contra o estresse oxidativo e promovendo a inibição da neuroinflamação (GUO et al., 2019).

Os dados obtidos estão de acordo com a literatura, onde a influência da silimarina livre sobre a atividade da AChE e BChE foi demonstrada por Nazir et al. (2018), sendo que o extrato bruto de sementes de *Silybum marianum* solubilizado em metanol apresentou um efeito antioxidante, inibindo as enzimas colinesterases, *in vitro*, apresentando para uma concentração de 250 µg/mL um valor de atividade enzimática para a AChE e BChE de 62,25 % e 62,42 %, respectivamente.

5.4 Consumo alimentar

A quantidade de alimento consumida pelas moscas nas diferentes concentrações foi medida para avaliar se o consumo foi igualitário para todas as concentrações, os dados estão dispostos na Figura 20.

Figura 20: Consumo alimentar em porcentagem das moscas em diferentes concentrações de silimarina e nanopartículas de silimarina, em água e etanol. Os dados são apresentados como a média \pm erro padrão. Cada ensaio foi realizado em três experiências independentes. A linha tracejada representa o valor do grupo controle. Significância determinada pela análise de variância unidirecional (ANOVA) seguida do teste de Tukey (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ em comparação ao controle água ou etanol).



Fonte: Autoria própria (2021)

O controle da quantidade de alimento ingerido pela mosca da fruta *Drosophila melanogaster* é necessária para estudos de comportamento, nutrição e administração de compostos (WONG et al., 2009).

Para avaliar o consumo das moscas nas diferentes concentrações de silimarina e NP de silimarina foi utilizado o corante azul brilhante FCF. Os dados da Figura 20 demonstram que as moscas tiveram um consumo significativo apenas para as concentrações de 160 e 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$, para o meio alimentar com o composto silimarina disperso em água, e para a concentração de 160 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para as nanopartículas em etanol, as demais concentrações e tratamentos não apresentaram mudanças significativas quando comparados aos seus respectivos controles. Com isso, o corante azul brilhante FCF mostrou-se útil como marcador para avaliar o consumo alimentar das moscas.

O corante azul brilhante também foi utilizado em trabalho realizado por Lushchak et al. (2011) para avaliar os efeitos do consumo de frutose e glicose no sistema de defesa no modelo *Drosophila melanogaster*, e para isso utilizaram larvas das moscas que foram expostas por 20 minutos ao corante.

6 CONCLUSÃO

Silimarina foi encapsulada pela técnica de dispersão sólida utilizando Poloxamer 407 como encapsulante. Os resultados da caracterização demonstraram que houve uma interação da silimarina com o encapsulante, constatando que o composto foi encapsulado na matriz polimérica de forma satisfatória.

Os resultados encontrados na avaliação do pH demonstraram que este permaneceu estável, sugerindo que o composto se manteve inalterado, pois a manutenção do pH é um indicativo de não haver degradação dos compostos. Em relação aos espectros UV-VIS de silimarina e das nanopartículas contendo silimarina, os espectros de absorção encontrados estão de acordo com a literatura.

Em relação aos estudos *in vitro*, os resultados mostraram que a silimarina e as nanopartículas contendo silimarina tem a capacidade de inibir a ação da enzima acetilcolinesterase (AChE) e butirilcolinesterase (BChE). Para os estudos *in vitro*, a silimarina apresentou melhores resultados quando solubilizada em etanol, resultado já esperado, devido ser um composto que apresenta baixa solubilidade em água. As nanopartículas possibilitaram que o composto apresentasse uma capacidade inibitória nas enzimas colinérgicas quando solubilizadas em água, e os resultados demonstraram que o polímero não apresentou o efeito *per se*. Para os ensaios *ex vivo*, as nanopartículas não inibiram significativamente a ação das enzimas acetilcolinesterase e butirilcolinesterase.

Em relação ao teste de sobrevivência utilizando como modelo a mosca de espécie *Drosophila melanogaster*, os resultados mostraram que a suplementação da dieta das moscas com a silimarina e com as nanopartículas não ocasionou letalidade para as moscas, indicando que o composto nas formas livres e em nanopartículas não apresentaram toxicidade nas concentrações utilizadas.

Para trabalhos futuros, sugere-se a realização de testes *in vitro* para as enzimas catalase e glutathione S-transferases, além de dar continuidade aos estudos *in vivo* utilizando as moscas *Drosophila melanogaster* como modelo biológico.

REFERÊNCIAS

- ABENAVOLI, L. *et al.* Milk thistle in liver diseases: past, present, future. **Phytotherapy Research**, v. 24, n. 10, p. 1423–1432, 2010.
- ABOSHANAB, M. H. A. *et al.* Fabrication, characterization and biological evaluation of silymarin nanoparticles against carbon tetrachloride-induced oxidative stress and genotoxicity in rats. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 587, p. 119639, 2020.
- ABOUZID, S. F. *et al.* *Silybum marianum* pericarp yields enhanced silymarin products. **Fitoterapia**, v. 112, p. 136–143, 2016.
- ADEDARA, I. A. *et al.* Diphenyl diselenide protects against mortality, locomotor deficits and oxidative stress in *Drosophila melanogaster* model of manganese-Induced neurotoxicity. **Neurochemical Research**, v. 41, n. 6, p. 1430–1438, 2016.
- AGATONOVIC-KUSTRIN, S.; KETTLE, C.; MORTON, D. W. A molecular approach in drug development for Alzheimer's disease. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 106, p. 553–565, 2018.
- AKINYEMI, A. J. *et al.* Curcumin-supplemented diets improve antioxidant enzymes and alter acetylcholinesterase genes expression level in *Drosophila melanogaster* model. **Metabolic Brain Disease**, v. 33, p. 369–37, 2018.
- ALARABY, M. *et al.* Antioxidant and antigenotoxic properties of CeO₂ NPs and cerium sulphate: Studies with *Drosophila melanogaster* as a promising *in vivo* model. **Nanotoxicology**, v. 9, n. 6, p. 749–759, 2015.
- ALMEIDA, H.; AMARAL, M. H.; LOBÃO, P. Comparative study of sustained-release lipid microparticles and solid dispersions containing ibuprofen. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 48, n. 3, p. 529–536, 2012.
- ANANDHARAMAKRISHNAN, C. Techniques for nanoencapsulation of food ingredients. In: **Techniques for Nanoencapsulation of Food Ingredients**. Springer, New York, NY: SpringerBriefs in Food, Health, and Nutrition, 2014.
- ANDRZEJEWSKA, J.; MARTINELLI, T.; SADOWSKA, K. *Silybum marianum*: Non-medical exploitation of the species. **Annals of Applied Biology**, v. 167, n. 3, p. 285–297, 2015.
- ARAÚJO, C. R. M.; SANTOS, V. L. A.; GONSALVES, A. A. Acetylcholinesterase - AChE: A pharmacological interesting enzyme. **Revista Virtual de Química**, v. 8, n. 6, p. 1818–1834, 2016.
- ARSALAN, A.; YOUNUS, H. Enzymes and nanoparticles: Modulation of enzymatic activity via nanoparticles. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 118, p. 1833–1847, 2018.
- ÁVILA, D. S.; RONCATO, J. F.; JACQUES, M. T. Nanotoxicology assessment in complementary/alternative models. **Energy, Ecology and Environment**, v. 3, n. 3, p. 72–80, 2018.

AZMIR, J. *et al.* Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: a review. **Journal of Food Engineering**, v. 117, p. 426–436, 2013.

BAGHEL, S.; CATHCART, H.; O'REILLY, N. J. Polymeric amorphous solid dispersions: a review of amorphization, crystallization, stabilization, solid-state characterization, and aqueous solubilization of biopharmaceutical classification system class II drugs. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 105, n. 9, p. 2527–2544, 2016.

BALATA, G.; SHAMROOL, H. Spherical agglomeration *versus* solid dispersion as different trials to optimize dissolution and bioactivity of silymarin. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 24, n. 5, p. 478–485, 2014.

BALIGA, M. S. *et al.* Polyphenols in the prevention of ulcerative colitis: past, present and future. In: **Polyphenols in Human Health and Disease**. 1. ed. London: Academic Press, 2013. p. 655–663.

BAZANA, M. T.; CODEVILLA, C. F.; DE MENEZES, C. R. Nanoencapsulation of bioactive compounds: challenges and perspectives. **Current Opinion in Food Science**, v. 26, p. 47–56, 2019.

BIJAK, M. Silybin, a major bioactive component of Milk Thistle (*Silybum marianum* L. Gaernt.)—chemistry, bioavailability, and metabolism. **Molecules**, v. 22, n. 11, p. 1–11, 2017.

BORAH, A. *et al.* Neuroprotective potential of silymarin against CNS disorders: insight into the pathways and molecular mechanisms of action. **CNS Neuroscience and Therapeutics**, v. 19, p. 847–853, 2013.

CAZARIN, K. C. C.; CORRÊA, C. L.; DUQUE ZAMBRONE, F. A. Reduction, refinement and replacement of animal use in toxicity testing: an overview. **Revista Brasileira de Ciências Farmaceuticas/Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 40, n. 3, p. 290–299, 2004.

CHAUDHARI, S. P.; DUGAR, R. P. Application of surfactants in solid dispersion technology for improving solubility of poorly water soluble drugs. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 41, p. 68–77, 2017.

COLOVIC, M. B. *et al.* Acetylcholinesterase inhibitors: pharmacology and toxicology. **Current Neuropharmacology**, v. 11, p. 315–335, 2013.

DA SILVA, R. P. F. F.; ROCHA-SANTOS, T. A. P.; DUARTE, A. C. Supercritical fluid extraction of bioactive compounds. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 76, p. 40–51, 2016.

DAN, P. *et al.* Evaluation of hydroxyapatite nanoparticles - induced *in vivo* toxicity in *Drosophila melanogaster*. **Applied Surface Science**, v. 484, p. 568–577, 2019.

DE AGUIAR, L. M. *et al.* Glyphosate-based herbicide exposure causes antioxidant defence responses in the fruit fly *Drosophila melanogaster*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part - C: Toxicology and Pharmacology**, v. 185, p. 94–101, 2016.

DE ALMEIDA, M. *et al.* Evaluation of the: *In vivo* acute antiinflammatory response of

- curcumin-loaded nanoparticles. **Food and Function**, v. 9, n. 1, p. 440–449, 2018.
- DE MELO, N. F. S. *et al.* Development and characterization of poli (L-lactide) nanocapsules containing benzocaine. **Quimica Nova**, v. 33, n. 1, p. 65–69, 2010.
- DE VOS, P. *et al.* Encapsulation for preservation of functionality and targeted delivery of bioactive food components. **International Dairy Journal**, v. 20, p. 292–302, 2010.
- DONSÌ, F. *et al.* Encapsulation of bioactive compounds in nanoemulsion- based delivery systems. **Procedia Food Science**, v. 1, p. 1666 – 1671, 2011.
- DORĐEVIĆ, V. *et al.* Trends in Encapsulation Technologies for Delivery of Food Bioactive Compounds. **Food Engineering Reviews**, v. 7, n. 4, p. 452–490, 2014.
- EL-MARASY, S. A.; ABD-ELSALAM, R. M.; AHMED-FARID, O. A. Ameliorative effect of silymarin on scopolamine-induced dementia in rats. **Open Access Macedonian Journal of Medical Sciences**, v. 6, n. 7, p. 1215–1224, 2018.
- ELATEEQ, A. A. *et al.* Biotechnological production of silymarin in *Silybum marianum L.*: a review. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 29, p. 101775, 2020.
- ELLMAN, G. L. *et al.* A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical Pharmacology**, v. 7, n. 2, p. 88–95, 1961.
- ELOY, J. O.; MARCHETTI, J. M. Solid dispersions containing ursolic acid in Poloxamer 407 and PEG 6000: a comparative study of fusion and solvent methods. **Powder Technology**, v. 253, p. 98–106, 2014.
- ELUFIOYE, T. O. *et al.* Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitory activity of some selected Nigerian medicinal plants. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 4, p. 472–477, 2010.
- ESSIEN, S. O.; YOUNG, B.; BAROUTIAN, S. Recent advances in subcritical water and supercritical carbon dioxide extraction of bioactive compounds from plant materials. **Trends in Food Science and Technology**, v. 97, p. 156–169, 2020.
- FAKHARI, A.; CORCORAN, M.; SCHWARZ, A. Thermogelling properties of purified poloxamer 407. **Heliyon**, v. 3, n. 8, p. 1–26, 2017.
- GARAVAND, F. *et al.* Different techniques for extraction and micro/nanoencapsulation of saffron bioactive ingredients. **Trends in Food Science and Technology**, v. 89, p. 26–44, 2019.
- GUO, H. *et al.* Silymarin's inhibition and treatment effects for Alzheimer's disease. **Molecules**, v. 24, n. 9, p. 1–17, 2019.
- HADDADI, R.; SHAHIDI, Z.; EYVARI-BROOSHGHALAN, S. Silymarin and neurodegenerative diseases: therapeutic potential and basic molecular mechanisms. **Phytomedicine**, v. 79, p. 153320, 2020.
- HAMPEL, H. *et al.* The cholinergic system in the pathophysiology and treatment of Alzheimer's disease. **Brain**, v. 141, p. 1917–1933, 2018.

- HE, Y.; HO, C. Amorphous solid dispersions: utilization and challenges in drug discovery and development. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 104, n. 10, p. 3237–3258, 2015.
- HONARY, S.; ZAHIR, F. Effect of zeta potential on the properties of nano-drug delivery systems - a review (part 1). **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 12, n. 2, p. 255–264, 2013.
- HUANG, Y.; DAI, W.-G. Fundamental aspects of solid dispersion technology for poorly soluble drugs. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, v. 4, n. 1, p. 18–25, 2014.
- HURLEY, D. *et al.* The effect of cooling on the degree of crystallinity, solid-state properties, and dissolution rate of multi-component hot-melt extruded solid dispersions. **Pharmaceutics**, v. 12, n. 212, p. 1–24, 2020.
- JEIBMANN, A.; PAULUS, W. *Drosophila melanogaster* as a model organism of brain diseases. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 10, n. 2, p. 407–440, 2009.
- JENNINGS, B. H. *Drosophila*-a versatile model in biology & medicine. **Materials Today**, v. 14, n. 5, p. 190–195, 2011.
- JIANG, Y.; GAO, H.; TURDU, G. Traditional chinese medicinal herbs as potential AChE inhibitors for anti-Alzheimer's disease: A review. **Bioorganic Chemistry**, v. 75, p. 50–61, 2017.
- KHAN, H. *et al.* Flavonoids as acetylcholinesterase inhibitors: current therapeutic standing and future prospects. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 101, p. 860–870, 2018.
- KHAN, I.; SAEED, K.; KHAN, I. Nanoparticles: properties, applications and toxicities. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 12, n. 7, p. 908–931, 2019.
- KHANNA, P. *et al.* Nanotoxicity: an interplay of oxidative stress, inflammation and cell death. **Nanomaterials**, v. 5, p. 1163–1180, 2015.
- KHAYATA, N. *et al.* Preparation of vitamin E loaded nanocapsules by the nanoprecipitation method: From laboratory scale to large scale using a membrane contactor. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 423, p. 419–427, 2012.
- KIM, J. Y. *et al.* Tyrosinase inhibitory study of flavonolignans from the seeds of *Silybum marianum* (Milk thistle). **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, 2019.
- KÜLKAMP, I. C. *et al.* Stabilization of lipoic acid by encapsulation in polymeric nanocapsules designed for cutaneous administration. **Quimica Nova**, v. 32, n. 8, p. 2078–2084, 2009.
- KUMAR, J. *et al.* Silymarin extends lifespan and reduces proteotoxicity in *C. elegans* Alzheimer's model. **CNS & Neurological Disorders - Drug Targets**, v. 14, n. 5, p. 295–302, 2015.
- KUMAR, N. *et al.* Silymarin liposomes improves oral bioavailability of silybin besides targeting hepatocytes, and immune cells. **Pharmacological Reports**, v. 66, p. 788–798, 2014.
- KUMAR, V.; SAHA, A.; ROY, K. *In silico* modeling for dual inhibition of

acetylcholinesterase (AChE) and butyrylcholinesterase (BuChE) enzymes in Alzheimer's disease. **Computational Biology and Chemistry**, v. 88, 2020.

LEIMANN, F. V. *et al.* Characterization of progesterone loaded biodegradable blend polymeric nanoparticles. **Ciência Rural**, v. 45, n. 11, p. 2082–2088, 2015.

LI, F. *et al.* Black soybean seed coat extract protects *Drosophila melanogaster* against Pb toxicity by promoting iron absorption. **Journal of Functional Foods**, v. 75, p. 104201, 2020.

LI, Q. *et al.* Recent progress in the identification of selective butyrylcholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 137, p. 294–309, 2017.

LILLESAAAR, C.; GASPAR, P. Serotonergic neurons in vertebrate and invertebrate model organisms (rodents, zebrafish, *Drosophila melanogaster*, *Aplysia californica*, *Caenorhabditis elegans*). In: **Serotonin: The Mediator that Spans Evolution**. 1. ed. Pilowsky, P.M.,: Elsevier: Philadelphia, PA, USA, 2018. p. 49–80.

LUNARDI, C. N. *et al.* Experimental methods in chemical engineering: zeta potential. **Canadian Journal of Chemical Engineering**, v. 99, n. 3, p. 626–626, 2021.

LUSHCHAK, O. V. *et al.* *Drosophila melanogaster* larvae fed by glucose and fructose demonstrate difference in oxidative stress markers and antioxidant enzymes of adult flies. **Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology**, v. 160, p. 27–34, 2011.

MARSANASCO, M. *et al.* Bioactive compounds as functional food ingredients: Characterization in model system and sensory evaluation in chocolate milk. **Journal of Food Engineering**, v. 166, p. 55–63, 2015.

MCGURK, L.; BERSON, A.; BONINI, N. M. *Drosophila* as an *in vivo* model for human neurodegenerative disease. **Genetics**, v. 201, p. 377–402, 2015.

MEGHREJI, A. M. *et al.* Validated method for silymarin by spectrophotometry in bulk drug and Pharmaceutical formulations. **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**, v. 2, n. 1, p. 396–400.

MOURDIKOU DIS, S.; PALLARES, R. M.; THANH, N. T. K. Characterization techniques for nanoparticles: Comparison and complementarity upon studying nanoparticle properties. **Nanoscale**, v. 10, p. 12871–12934, 2018.

NAZIR, N. *et al.* Phytochemical analysis, molecular docking and anti-amnesic effects of methanolic extract of *Silybum marianum* (L.) Gaertn seeds in scopolamine induced memory impairment in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 210, p. 198–208, 2018.

NEDOVIC, V. *et al.* An overview of encapsulation technologies for food applications. **Procedia Food Science**, v. 1, p. 1806 – 1815, 2011.

OBOH, G. *et al.* Anticholinesterase activity and antioxidant properties of *Heinsia crinita* and *Pterocarpus soyauxii* in *Drosophila melanogaster* model. **Journal of Ayurveda and**

Integrative Medicine, v. 12, p. 254–260, 2021.

ONG, C. *et al.* *Drosophila melanogaster* as a model organism to study nanotoxicity. **Nanotoxicology**, v. 9, n. 3, p. 396–403, 2015.

ORDÓÑEZ, J. A. *et al.* Vitaminas, minerais e enzimas. In: **Tecnologia de Alimentos: Componentes dos Alimentos e Processos**. 1. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. p. 92–101.

PANCHAL, K.; TIWARI, A. K. *Drosophila melanogaster* “a potential model organism” for identification of pharmacological properties of plants/plant-derived components. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 89, p. 1331–1345, 2017.

PATEIRO, M. *et al.* Nanoencapsulation of promising bioactive compounds to improve their absorption, stability, functionality and the appearance of the final food products. **Molecules**, v. 26, p. 1–26, 2021.

PEREIRA, G. G. *et al.* Formulation and characterization of poloxamer 407®: thermoreversible gel containing polymeric microparticles and hyaluronic acid. **Quimica Nova**, v. 36, n. 8, p. 1121–1125, 2013.

PORTO DE SOUZA VANDENBERGHE, L. *et al.* Classification of enzymes and catalytic properties. In: **Biomass, Biofuels, Biochemicals**. 1. ed. Amsterdam: Elsevier, 2020. p. 11–30.

RAJNOCHOVÁ SVOBODOVÁ, A. *et al.* Phototoxic potential of silymarin and its bioactive components. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 156, p. 61–68, 2016.

REZAEI, A.; FATHI, M.; JAFARI, S. M. Nanoencapsulation of hydrophobic and low-soluble food bioactive compounds within different nanocarriers. **Food Hydrocolloids**, v. 88, p. 146–162, 2019.

SAMTIYA, M. *et al.* Potential health benefits of plant food-derived bioactive components: an overview. **Foods**, v. 10, n. 4, p. 1–25, 2021.

SAXENA, V.; HUSSAIN, M. D. Polymeric mixed micelles for delivery of curcumin to multidrug resistant ovarian cancer. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 9, p. 1146–1154, 2013.

SCHAFFAZICK, S. R. *et al.* Physicochemical characterization and stability of the polymeric nanoparticle systems for drug administration. **Quimica Nova**, v. 26, n. 5, p. 726–737, 2003.

SCHLIEBS, R.; ARENDT, T. The cholinergic system in aging and neuronal degeneration. **Behavioural Brain Research**, v. 221, p. 555–563, 2011.

SHARMA, K. Cholinesterase inhibitors as Alzheimer’s therapeutics (review). **Molecular Medicine Reports**, v. 20, p. 1479–1487, 2019.

SILVA DE SÁ, I. *et al.* *In vitro* and *in vivo* evaluation of enzymatic and antioxidant activity, cytotoxicity and genotoxicity of curcumin-loaded solid dispersions. **Food and Chemical Toxicology**, v. 125, p. 29–37, 2019.

SIMONAZZI, A. *et al.* Preparation and characterization of Poloxamer 407 solid dispersions

as an alternative strategy to improve benzimidazole bioperformance. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 107, p. 2829–2836, 2018.

SINGH, A. *et al.* Silymarin encapsulated nanoliquid crystals for improved activity against beta amyloid induced cytotoxicity. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 149, p. 1198–1206, 2020.

SNIMA, K. S. *et al.* Silymarin encapsulated Poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) nanoparticles: a prospective candidate for prostate cancer therapy. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, 2014.

SOLANGI, K. H. *et al.* A comprehensive review of thermo-physical properties and convective heat transfer to nanofluids. **Energy**, v. 89, p. 1065–1086, 2015.

SONALI, D. *et al.* Silymarin-solid dispersions: characterization and influence of preparation methods on dissolution. **Acta Pharmaceutica**, v. 60, p. 427–443, 2010.

SORNSUVIT, C. *et al.* The Bioavailability and pharmacokinetics of silymarin SMEDDS formulation study in healthy thai volunteers. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, p. 1–7, 2018.

SUNDARARAJAN, V. *et al.* *Drosophila melanogaster* as an *in vivo* model to study the potential toxicity of cerium oxide nanoparticles. **Applied Surface Science**, v. 490, p. 70–80, 2019.

THEODOSIOU, E. *et al.* Bioavailability of silymarin flavonolignans: drug formulations and biotransformation. **Phytochemistry Reviews**, v. 13, p. 1–18, 2014.

VALKOVÁ, V. *et al.* Milk thistle (*Silybum marianum*): a valuable medicinal plant with several therapeutic purposes. **Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences**, v. 9, n. 4, p. 836–843, 2020.

VYAS, V. *et al.* Physicochemical characterization of solid dispersion systems of tadalafil with poloxamer 407. **Acta Pharmaceutica**, v. 59, p. 453–461, 2009.

WANI, S. U. D. *et al.* Enhancing therapeutic potential of poor aqueous soluble herbal drugs through solid dispersion-An overview. **Phytomedicine Plus**, v. 1, n. 4, p. 100069, 2021.

WEN, P. *et al.* Electrospinning: a novel nano-encapsulation approach for bioactive compounds. **Trends in Food Science and Technology**, v. 70, p. 56–68, 2017.

WONG, R. *et al.* Quantification of food intake in *Drosophila*. **PLoS ONE**, v. 4, n. 6, p. e6063, 2009.

YAMAGUCHI, M.; YOSHIDA, H. *Drosophila* as a model organism. In: **Advances in Experimental Medicine and Biology**. Singapore: 1076 :Springer, 2018. p. 1–10.

YANG, K. Y. *et al.* Silymarin-loaded solid nanoparticles provide excellent hepatic protection: Physicochemical characterization and *in vivo* evaluation. **International Journal of Nanomedicine**, v. 8, p. 3333–3343, 2013.

YOUSAF, A. M. *et al.* Silymarin-laden PVP-nanocontainers prepared via the electrospaying

technique for improved aqueous solubility and dissolution rate. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 62, 2019.

YOUSEFDOOST, S. *et al.* Application of nanoencapsulated silymarin to improve its antioxidant and hepatoprotective activities against carbon tetrachloride-induced oxidative stress in broiler chickens. **Livestock Science**, v. 228, p. 177–186, 2019.

YU, D.-G. *et al.* Polymer-based nanoparticulate solid dispersions prepared by a modified electrospraying process. **Journal of Biomedical Science and Engineering**, v. 4, p. 741–749, 2011.

ZENG, Q. *et al.* The nanotoxicity investigation of optical nanoparticles to cultured cells *in vitro*. **Toxicology Reports**, v. 1, p. 137–144, 2014.