

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

DAYANE ALVES LEÃO

**CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DA
BERBERINA ENCAPSULADA COM POLOXAMER 407 EM
*Drosophila Melanogaster***

**CAMPO MOURÃO
2021**

DAYANE ALVES LEÃO

**CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DA
BERBERINA ENCAPSULADA COM POLOXAMER 407 EM
*Drosophila melanogaster***

**CHARACTERIZATION AND EVALUATION OF THE TOXICITY OF BERBERINE
ENCAPSULATED WITH POLOXAMER 407 IN *Drosophila melanogaster***

Dissertação apresentada como requisito para obtenção do título de Mestre no Programa da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR).

Orientador: Prof. Dr. Rafael Porto Ineu.

Coorientadora: Dra. Patrícia Appelt.

CAMPO MOURÃO

2021



[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.



Ministério da Educação
Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Campus Medianeira



DAYANE ALVES LEAO

**CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DA BERBERINA ENCAPSULADA COM POLOXAMER
407 EM DROSOPHILA MELANOGASTER**

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

Data de aprovação: 21 de Dezembro de 2021

Prof Rafael Porto Ineu, - Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Prof Mario Antonio Alves Da Cunha, - Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Prof.a Sara Cristina Sagae Schneider, Doutorado - Universidade Estadual do Oeste do Paraná (Unioeste)

Prof.a Stephani Caroline Beneti, - Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Documento gerado pelo Sistema Acadêmico da UTFPR a partir dos dados da Ata de Defesa em 21/12/2021.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus e a toda minha família, especialmente a minha mãe Corina Alves Leão, aos meus irmãos Anderson Alves Leão e Andreia C. Alves Leão Guilhem, as minhas sobrinhas Sara Leão Guilhem e Gabriela Leão Guilhem, meu cunhado Giuliano Guilhem e cunhada Gleissa Rorato que em todos momentos, com todas dificuldades enfrentadas e quando pensei em desistir, eles estavam apostos para me apoiar com palavras de incentivo e apoio.

À Universidade Tecnológica Federal do Paraná Campus Campo Mourão, pelo espaço físico e pelo ensino de qualidade que me proporcionou, assim como aos professores que colaboraram direta ou indiretamente para eu obter o título de Mestre.

Agradeço ao meu orientador, Dr. Rafael Porto Ineu, pela disponibilidade de ensinar e acompanhar a construção desse trabalho ao longo desses dois anos. Agradecimento especial para minha coorientadora Dra. Patrícia Appelt que, ao longo dessa jornada, fez muito mais do que me orientar, além de ter sido uma orientadora dedicada, foi, é, e sempre será uma grande amiga e um exemplo a ser seguido.

Também agradeço o professor Dr. Odinei Hess Gonçalves, pela paciência e persistência, por toda experiência e conhecimento transmitido e apoio no trabalho. A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos (PPGTA).

Aos colegas de trabalho, pela convivência, discussões e contribuições. Especialmente a Katia Pavesi, por toda força e conselhos ao longo desse tempo. E agradeço aos meus colegas de estudos, pesquisa e laboratório, Pamela Golin, Daniela Cristina Souza, Janmille Monteiro, Viviane A. De Medeiros, Amarilis Carvalho e a Bruna Franzon Rossi que de alguma forma ajudaram na produção do trabalho e todos que direta ou indiretamente participaram desta trajetória comigo, meus sinceros agradecimentos.

Por fim, agradeço a todas as pessoas que contribuíram de alguma forma com a conclusão deste mestrado.

RESUMO

A berberina é um alcaloide isoquinolínico, de sabor amargo e cor amarela, apresentando múltiplas atividades farmacológicas e biológicas. Possui características conhecidas como antioxidantes, anti-inflamatórias e neuroprotetora. Sua baixa biodisponibilidade, insolubilidade em água e instabilidade limitam sua aplicação, dificultando sua ação e absorção. Sendo assim, a nanotecnologia tem atraído muita atenção porque pode alterar a absorção da berberina e modificar seus efeitos, tanto *in vivo* quanto *ex vivo*. Várias técnicas podem ser usadas para melhorar a dissolução e biodisponibilidade de bioativo pouco solúveis em água, dentre elas existe as dispersões sólidas. Entretanto, até o momento pouco é conhecido em relação a toxicidade das nanopartículas contendo berberina em modelos de animais. Para isso, a *Drosophila Melanogaster* (DM) conhecida como mosca da fruta, é usada como um excelente modelo para a investigação da toxicidade de nanopartículas entre outros. Assim, o objetivo desse trabalho é a produção de nanopartículas de berberina e avaliar a toxicidade em *Drosophila Melanogaster* como um modelo biológico alternativo. A nanoencapsulação da berberina com o encapsulante Poloxamer 407 (P407) foi obtida através da técnica de dispersão sólida por evaporação do solvente. As nanopartículas (NPs), assim como a berberina livre (BBR), Poloxamer 407 e a mistura física (BBR + P407) foram caracterizados pelas técnicas de calorimetria diferencial de varredura (DSC), espectrofotometria no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), espectroscopia eletrônica na região do UV-VIS. Também foi realizado a determinação do pH de soluções NPs e BBR livre no período de 60 dias, expostas a luz ou armazenadas em frascos âmbar, a fim de verificar a estabilidade química dos compostos. A caracterização das nanopartículas evidenciaram uma mudança no estado físico da berberina livre do estado cristalino para o amorfo, demonstrando eficiência na encapsulação. Nas análises de DSC para berberina livre foram observados vários eventos térmicos, com um pico amplo exotérmico onde estão agregados à região de transição vítrea (T_g), região de cristalização fria e processo de fusão (T_m), com um grau de cristalinidade (X_c %) de 74,60%. O P407 obteve um pico exotérmico logo no início (61,7°C) atingindo um grau de cristalinidade de 124,82% e uma T_g 55°C, e tanto a nanopartículas quanto a mistura física também apresentaram eventos térmicos no início. Os resultados obtidos mostram que os espectros do FTIR em algumas regiões apresentaram grupos funcionais diferentes, com bandas a berberina livre em torno de 3095 cm^{-1} a 3600 cm^{-1} , referentes ao estiramento =C-H sp^2 , ainda vibrações em 2900 cm^{-1} referentes ao grupo metila CH_3 nas nanopartículas e bandas 2289 cm^{-1} e 2883 cm^{-1} . A partir do monitoramento do pH das soluções de NPs BBR e BBR livre, pode-se notar que não ocorreu alterações em 60 dias de medida. Para as NPs BBR armazenadas em frascos âmbar o pH foi de 5,93, enquanto que as NPs BBR expostas a luz o pH foi de 5,74, para a BBR livre em frasco âmbar o pH=6,04 e exposto a luz pH=6,07, respectivamente. Assim, tanto as NPs BBR e a BBR livre apresentaram estabilidade química, o que foi também evidenciado por UV-VIS nas soluções iniciais e finais. Após otimização das condições de síntese, foram obtidas NPs de berberina sem filtração com o diâmetro médio de aproximadamente 218,5 nm e NPs de berberina filtrada 307,4 nm e potencial Zeta de -3,15 e -5,34 mV. Resultados *in vivo* utilizando *Drosophila Melanogaster* demonstraram que as nanopartículas contendo berberina BBr Livre e BBr Livre_EtOH em todas as concentrações não apresentaram alterações significativas na taxa de sobrevivência quando comparadas ao controle. Mudança no desempenho locomotor das moscas suplementadas com BBr Livre, BBr Livre_EtOH, NPs BBr exibiram um déficit motor

significativo dependente da dose. O teste de campo aberto mostra que o grupo exposto à BBr Livre e BBr Livre_EtOH a concentração de 30 μ M apresentou menor atividade exploratória quando comparado ao grupo controle já NPs BBr a concentração que apresentou menor atividade exploratória foi a de 10 μ M. Ensaio de viabilidade celular mostraram que o índice de sobrevivência com amostras de BBr Livre, BBr Livre_EtOH e NPs BBr a maioria foram acima de 90%, o que indica uma baixa citotoxicidade para todas as amostras. Na dieta suplementada utilizando corante alimentar azul brilhante as *Drosophila Melanogaster* diminuíram o consumo no tratamento com BBr Livre e nos tratamentos com BBr Livre_EtOH e NPs BBr teve um consumo maior que 90%. Nos testes *ex vivo*, não houve inibição na atividade da acetilcolinesterase (AChE) e da butirilcolinesterase (BChE). Os resultados indicam que foi possível encapsular a berberina na matriz polimérica, que mostrou baixa toxicidade, sugerindo o uso de modelos biológicos alternativos.

Palavras-chaves: bioativos; encapsulantes; enzimas colinérgicas; modelo biológico alternativo.

ABSTRACT

Berberine is an isoquinoline alkaloid, of bitter taste and yellow color, presenting multiple pharmacological and biological activities, has characteristics already known as antioxidants, anti-inflammatory and neuroprotective. Its low bioavailability, water insolubility and instability limit its application, hindering its action and absorption. Therefore, nanotechnology has attracted a lot of attention because it can alter berberine absorption and modify its effects, both *in vivo* and *ex vivo*. Several techniques can be used to improve the dissolution and bioavailability of bioactive with low solubility in water, among them there are solid dispersions. However, up to now, little is known in relation to the toxicity of berberine-containing nanoparticles in animal models. For this, *Drosophila Melanogaster* (DM) known as fruit fly has been used as an excellent model for the investigation of nanoparticle toxicity. Thus, the objective of this work is the production of berberine nanoparticles and to evaluate the toxicity in *Drosophila Melanogaster* as an alternative biological model. Berberine nanoencapsulation with the encapsulant Poloxamer 407 (P407) was obtained through the solid dispersion technique by solvent evaporation. Nanoparticles (NPs), as well as free berberine (BBR), Poloxamer 407 and physical mixture (BBR + P407) were characterized by differential scanning calorimetry (DSC), Fourier transform infrared spectrophotometry (FTIR), electronic spectroscopy in the UV-VIS region. The pH of NPs and BBR solutions was also performed within 60 days, exposed to light or stored in amber vials, in order to verify the chemical stability of the compounds. The characterization of the nanoparticles evidenced a change in the physical state of berberine free from the crystalline state to amorphous, demonstrating efficiency in encapsulation. In the analysis of DSC for free berberine we observed several thermal events, with a broad exothermic peak where they are added to the vitreous transition region (T_g), cold crystallization region and melting process (T_m), with a degree of crystalline (X_c %) 74.60%. The P407 obtained an exothermic peak early on (61.7°C) reaching a degree of crystallinity of 124.82% and a T_g 55°C, and both nanoparticles and physical mixture presented thermal events at the beginning. The results obtained show that the FTIR spectra in some regions showed different functional groups, with free berberine bands around 3095 cm^{-1} to 3600 cm^{-1} , referring to the stretch =CH sp^2 , still vibrations at 2900 cm^{-1} referring to the CH_3 methyl group in the nanoparticles and bands 2289 cm^{-1} and 2883 cm^{-1} . From the monitoring of the pH of BBR NPs and free BBR solutions, it can be noted that there were no changes in 60 days of measurement. For BBR NPs stored in amber vials the pH was 5.93, while BBR NPs exposed to light the pH was 5.74, for the free BBR in amber bottle the pH=6.04 and exposed to pH=6.07 light, respectively. Thus, both BBR NPs and BBR free showed chemical stability, which was also evidenced by UV-VIS in the initial and final solutions. After optimization of the synthesis conditions, unfiltered berberine NPs with a mean diameter of approximately 218.5 nm and filtered berberine NPs of 307.4 nm and Zeta potential of -3.15 and -5.34 mV were obtained. *In vivo* results using *Drosophila Melanogaster* showed that nanoparticles containing berberine promoted a significant mortality rate, whereas the treatment containing Free BBR and Free BBR_EtOH at all concentrations did not show significant changes in the survival rate when compared to the control. Change in locomotor performance of flies supplemented with Free BBR, Free BBR_EtOH, NPs BBR exhibited a dose-dependent significant motor deficit. The open field test shows that the group exposed to Free BBR and Free BBR_EtOH at a concentration of 30 μM showed lower exploratory activity when compared to the control group with NPs BBR, the concentration that showed lower exploratory activity was 10 μM . Cell viability assays

showed that the survival rate with samples of Free BBr, Free BBr_EtOH and most BBr NPs were above 90%, which indicates a low cytotoxicity for all samples. In the diet supplemented using bright blue food coloring, *Drosophila Melanogaster* decreased consumption in the treatment with Free BBr and in the treatments with Free BBr_EtOH and NPs BBr had a consumption greater than 90%. In ex vivo tests, there was no inhibition of acetylcholinesterase (AChE) and butyrylcholinesterase (BChE) activity. The results indicate that it was possible to encapsulate berberine in the polymeric matrix, as well as showing low toxicity, suggesting the use of alternative biological models.

Keywords: bioactives; encapsulants; cholinergic enzymes; alternative biological model.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: <i>Berberis vulgaris</i> (A) e Estrutura química da berberina (B).....	21
Figura 2: Dispersões sólidas com visão micromolecular	23
Figura 3: Fluxograma ilustrando das gerações das dispersões sólidas	25
Figura 4: Estruturas químicas do (a) poli (etileno glicol) (PEG) e (b) Poloxamer 40729	
Figura 5: Ciclo de vida das <i>Drosophila Melanogaster</i>	30
Figura 6: <i>Drosophila Melanogaster</i> fêmea.....	31
Figura 7: Sinapse colinérgica na atividade da AChE.....	33
Figura 8: Estrutura da AChE da <i>Drosophila Melanogaster</i>	33
Figura 9: Fluxograma da obtenção das nanopartículas da Berberina	36
Figura 10: Forno DSC	37
Figura 11: Aparelho de FTIR (A) e pastilhas de brometo de potássio (KBR) (B)	38
Figura 12: Espectrofotômetro portátil de fibra.....	38
Figura 13: pHmetro PG2000.....	39
Figura 14: Esquema ilustrativo do teste in vivo.....	41
Figura 15: Geotaxia Negativa e Teste Base - Topo	42
Figura 16: Avaliação do comportamento e atividade exploratória das moscas	43
Figura 17: Reação de redução do MTT (um sal de coloração amarela e solúvel em água) a formazan (sal de coloração arroxeadada e insolúvel em água).....	44
Figura 18: Esquema ilustrativo efeito do consumo da dieta suplementada com berberina e corante alimentar azul.....	46
Figura 19: Espectrofotômetro (A) e placa de elisa (B).....	47
Figura 20: Dispersões aquosas de BBr Livre (A), BBr Livre_EtOH (B) e NPs BBr (C)	48
Figura 21: Curvas de DSC P407, NPs BBr, MF, BBr Livre	49
Figura 22: Espectros de FTIR P407, NPs BBr, MF, BBr Livre	50
Figura 23: Espectros UV-visíveis BBr Livre, P407 e NPs BBr	52
Figura 24: Medidas de pH na BBr Livre (luz) e BBr (escuro) (A) e NPs BBr (luz) e NPs BBr (escuro) (B)	53
Figura 25: Espectro de absorção para formulações de NPs BBr (tempo zero), NPs BBr protegido da luz 60 dias e NPs BBr exposto a luz 60 dias.....	54
Figura 26: Efeito da dieta suplementada com BBr Livre (A), BBr Livre_EtOH (B) e NPs BBr (C) na taxa de sobrevivência em <i>D. melanogaster</i> . Os dados foram coletados a cada 24 horas para cada grupo durante 5 dias. Os dados são apresentados como a média \pm erro padrão.....	57
Figura 27: Efeito da dieta suplementada com controle, BBr Livre em água (BBr Livre) (A), BBr Livre em etanol (BBr Livre_EtOH) (B) e nanopartículas contendo BBr (NPs BBr) (C), na função locomotora em <i>Drosophila Melanogaster</i> . Taxa de escalada (expressa como o tempo gasto em segundos para escalar 8 cm). A linha tracejada representa os valores do controle. Os dados são apresentados como a média \pm erro padrão. Cada ensaio foi realizado em cinco experiências independentes (* $p < 0,05$ em relação ao controle). Os grupos de controle receberam dieta com suplemento padrão contendo água ou etanol	59

Figura 28: Efeito da dieta suplementada com controle, BBr Livre em água (BBr Livre), BBr Livre em etanol (BBr Livre_EtOH) e nanopartículas contendo BBr (NPs BBr), na função locomotora em *Drosophila Melanogaster*. Número de moscas no topo (expresso como porcentagem de escalada de 6 cm em 5 s) por ensaio de base topo em moscas suplementadas com BBr Livre (D), BBr Livre_EtOH (E) e NPs BBr (F). A linha tracejada representa os valores do controle. Os dados são apresentados como a média \pm erro padrão. Cada ensaio foi realizado em cinco experiências independentes (* $p < 0,05$ em relação ao controle). Os grupos de controle receberam dieta com suplemento padrão contendo água ou etanol.....61

Figura 29: Efeito da dieta suplementada com controle, BBr Livre (A), BBr Livre_EtOH (B) e nanopartículas contendo NPs BBr (C), na função locomotora em *Drosophila Melanogaster*. Valores de cruzamento (expressos como número de cruzamentos de uma área de 1 cm³). A linha tracejada representa os valores do controle. Os dados são apresentados como a média \pm erro padrão. Cada ensaio foi realizado em cinco experiências independentes (* $p < 0,01$ em relação ao controle). Os grupos de controle receberam dieta com suplemento padrão contendo água ou etanol.....64

Figura 30: Gráfico da viabilidade celular com controle, BBr Livre (A), BBr Livre_EtOH (B) e NPs BBr, ex vivo no tecido de *Drosophila Melanogaster*. Resultados expressos em porcentagens de células viáveis.....66

Figura 31: Avaliação da dieta suplementada com BBr Livre (A), BBr Livre_EtOH (B), NPs BBr (C) e corante azul brilhante em ex vivo no tecido de *Drosophila Melanogaster*. Resultados expressos em porcentagens.68

Figura 32: Efeito da BBr Livre (A), BBr Livre_EtOH (B) e NPs BBr (C), na atividade da enzima AChE ex vivo no tecido de *Drosophila Melanogaster*. A linha tracejada representa o valor do grupo controle. Valores expressos em média \pm erro padrão (n = 5 por grupo). Significância determinada pela análise de variância unidirecional (ANOVA) seguida do teste de Tukey. Os grupos de controle receberam dieta com suplemento padrão contendo água ou etanol71

Figura 33: Efeito da BBr Livre (A), BBr Livre_EtOH (B) e NPs BBr (C), na atividade da enzima BChE ex vivo no tecido de *Drosophila Melanogaster*. A linha tracejada representa o valor do grupo controle. Valores expressos em média \pm erro padrão (n = 5 por grupo). Significância determinada pela análise de variância unidirecional (ANOVA) seguida do teste de Tukey. Os grupos de controle receberam dieta com suplemento padrão contendo água ou etanol.72

LISTA DE TABELA

Tabela 1: Dados obtidos por DLS referentes ao valor, média, Pdl e potencial zeta da nanopartículas de Berberina (NPs Berberina). Os valores estão representados como média das medidas realizadas em triplicata55

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACh	Acetilcolina
AChE	Acetilcolinesterase
BBR	Berberina
BBr Livre	Berberina Livre
BBr Livre_EtOH	Berberina Livre em Etanol
BChE	Butirilcolinesterase
EROs	Espécies reativas de oxigênio
DM	<i>Drosophila Melanogaster</i>
DRX	Difração de Raios-X
DMSO	Dimetilssulfóxido
DSC	Calorimetria Diferencial de Varredura
DTNB	5,5'-Dithiobis (ácido 2-nitrobenzóico)
ECVAM	Centro Europeu de Validação de Métodos Alternativos
FDA	Food and Drug Administration
FTIR	Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier
GSH	Glutathiona reduzida
GST	Glutathiona S-transferase
KBR	Brometo de potássio
MF	Mistura Física
MTT	Brometo 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5 difeniltetrazólioLi
NPs	Nanopartículas
NPs BBr	Nanopartículas de Berberina
P407	Poloxamer 407
TEM	Microscopia Eletrônica de Transmissão
Tris-HCL	Hidroximetil aminometano
TFK	Tampão fosfato de potássio

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 OBJETIVOS	19
2.1 Objetivo Geral	19
2.2 Objetivos Específicos	19
3 REVISÃO DE LITERATURA	20
3.1 Compostos Bioativos	20
3.2 Atividades Biológicas Da Berberina (BBr)	20
3.3 Dispersões Sólidas	22
3.3.1 Dispersões sólidas de primeira geração	25
3.3.2 Dispersões sólidas de segunda geração	26
3.3.3 Dispersões sólidas de terceira geração	26
3.3.4 Dispersões sólidas de quarta geração.....	27
3.5 Polímeros	28
3.5.1 Poloxamer.....	28
3.6 <i>Drosophila Melanogaster</i>	30
3.7 Sistema Colinérgico	32
3.7.1 Estresse oxidativo.....	34
4 MATERIAL E MÉTODOS	35
4.1 Material	35
4.2 Nanoencapsulação da berberina	35
4.3 Caracterização das amostras	36
4.3.1 Análise de estabilidade por calorimetria diferencial de varredura (DSC)	36
4.3.2 Espectroscopia de infravermelho com transformada de fourier (FTIR).....	37
4.3.3 Espectroscopia eletrônica na região do UV-VIS	38
4.3.4 Determinação do valor pH das NPs Berberina	39
4.3.5 Espalhamento de luz dinâmico (DLS) e potencial zeta da nanopartículas de berberina (NPs Berberina).....	40
4.4 Ensaios biológicos	40
4.4.1 Ensaio in vivo.....	40
4.4.1.1 Taxa de sobrevivência/mortalidade	40
4.4.1.2 Geotaxia negativa	41
4.4.1.3 Teste base – topo	42
4.4.1.4 Teste de campo aberto	43

4.4.2 Ensaio ex vivo	43
4.4.2.1 Homogeneização pós taxa de sobrevivência/análises biológicas.....	43
4.4.2.2 Avaliação de citotoxicidade celular	44
4.4.2.3 Avaliação do efeito do consumo da dieta suplementada com berberina e corante alimentar azul brilhante nas <i>Drosophila Melanogaster</i>	45
4.4.2.4 Determinação de atividade da acetilcolinesterase (AChE)	46
4.4.2.5 Determinação de atividade da Butirilcolinesterase (BChE).....	47
4.5 Análise estatística.....	47
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
5.1 Caracterização das nanopartículas.....	48
5.1.1 Espalhamento de luz dinâmico (DLS) e potencial zeta das nanopartículas de Berberina (NPs Berberina).....	55
5.2 Ensaio in vivo em <i>Drosophila Melanogaster</i>.....	56
5.2.1 Taxa de sobrevivência/mortalidade	56
5.2.2 Desempenho locomotor em <i>Drosophila Melanogaster</i>	58
5.2.3 Teste de campo aberto	63
5.3. Ensaio ex vivo em <i>Drosophila Melanogaster</i>.....	66
5.3.1 Avaliação de citotoxicidade celular	66
5.3.2 Avaliação do efeito do consumo da dieta suplementada com berberina e corante alimentar azul brilhante nas <i>Drosophila Melanogaster</i>	68
5.3.3 Determinação da atividade das colinesterases AChE e BChE	70
6 CONCLUSÃO.....	75
REFERÊNCIAS	76

1 INTRODUÇÃO

Os compostos bioativos trazem benefícios à saúde, incluindo a redução do risco de desenvolvimento de doenças crônicas degenerativas. Plantas contendo fitoquímicos benéficos podem complementar as necessidades do corpo humano agindo como antioxidantes naturais. Muitas plantas conhecidas já foram utilizadas em estudos farmacêuticos trazendo um impacto positivo no sistema de saúde (ALTEMIMI et al., 2017)

Dentre tantas plantas, a berberina tem chamado a atenção. A berberina comumente conhecida como “Daru haldi” ou açafão-da-índia, é uma isoquinolina alcalóide, extraído da casca do caule e raízes de uma planta chamado *Berberis aristata*. Conhecida também como "amarelo natural 18", de flores amareladas e frutos vermelhos, um corante da classe das piridinas de gosto amargo, uma planta cujo arbusto possui entre 1 e 3 metros de altura (SAHIBZADA et al., 2021; WANG et al., 2017). Estudos relatam que a berberina possui inúmeros benefícios farmacológicos, inclusive para tratamentos contra a hepatite, câncer, estomatite, diarreia e diabetes tipo 2. Além disso, apresenta poderosos efeitos como antioxidante, antiprotozoário, antimicrobiano e anti-inflamatório (LI et al., 2019b; LIU et al., 2016; SAHIBZADA et al., 2021).

Apesar de todos os benefícios a berberina tem baixa solubilidade em água, resultando em baixa taxa de dissolução e biodisponibilidade, desta forma dificultando sua taxa de dissolução e seu uso clínico, levantando assim a importância da discussão de estratégias para melhorar suas limitações (LIU et al., 2016; SAHIBZADA et al., 2021).

Desta forma, a nanotecnologia tem sido aplicada, com foco na fabricação, caracterização e manipulação de nanoestruturas com bioativo. Da segurança alimentar à síntese molecular de novos produtos e novos ingredientes, essas aplicações na ciência de alimentos frequentemente afetam aspectos importantes, como a indústria de alimentos (PATHAKOTI; MANUBOLU; HWANG, 2017). Além disso o encapsulamento causa a estabilização dos materiais ativos, uma vez que o material da parede atua como uma barreira física para proteger o composto ativo (SALARI et al., 2015).

A fim de superar as limitações de encapsulamento várias técnicas foram desenvolvidas para nanoencapsular compostos biologicamente ativos, como por eletrofiação (REZAUL et al., 2018), emulsão (PISOSCHI et al., 2018) nanoesponjas e nanogéis (REZAEI; FATHI; JAFARI, 2019), e dispersão sólida (SILVA DE SÁ et al., 2019).

Os estudos de nanotoxicidade podem ser explicados na fase de avaliação, onde a caracterização bem definida de nanopartículas é considerada uma pesquisa preliminar, com o objetivo de correlacionar respostas biológicas (CABALLERO-DÍAZ; VALCÁRCEL CASES, 2016). Ainda há muitas incertezas sobre os riscos que a nanotecnologia pode trazer ao ser humano devido a sua aplicação, relacionada à verificação da toxicidade das nanopartículas para avaliar seus riscos à saúde (HE; HWANG, 2016; KUMAR et al., 2020). Algumas técnicas para a determinação da toxicidade de compostos estão sendo utilizadas principalmente em vertebrados, entretanto modelos alternativos podem estar substituindo efetivamente inúmeras vantagens, incluindo baixo custo (KLIMACZEWSKI et al., 2018). A toxicidade pode ser definida como uma reação adversa relacionada aos agentes físicos, químicos e biológicos nos seres humanos, animais e meio ambiente (KUMAR et al., 2020).

De maneira geral, as pesquisas atuais sobre a toxicidade de nanoestruturas utilizadas na ciência alimentar são limitadas e, comparadas aos efeitos benéficos que vêm sendo propostos, pouco se sabe sobre a citotoxicidade de antioxidantes na forma de nanocápsulas. Portanto, mais pesquisas são necessárias para avaliar a toxicidade potencial das nanopartículas para uso seguro nas indústrias alimentícia e farmacêutica (CAMBRUSSI et al., 2018).

Alguns fatores que podem representar riscos à saúde humana incluem o estresse oxidativo, que se caracteriza por um desequilíbrio entre o acúmulo e a remoção de radicais livres. Esse desequilíbrio pode ocorrer devido à diminuição da atividade de enzimas antioxidantes endógenas essenciais ou ao acúmulo de espécies reativas de oxigênio (ROS) (LIAQUAT et al., 2018). Os antioxidantes endógenos são produtos do próprio metabolismo do organismo, que podem ser divididos em enzimáticos ou não enzimáticos (MIROŃCZUK-CHODAKOWSKA; WITKOWSKA; ZUJKO, 2018). O sistema colinérgico (enzimático) é composto por células nervosas que utilizam o neurotransmissor acetilcolina (ACh) para transmitir potenciais de ação (TRIVEDI et al., 2017). A colinesterase animal é uma enzima encontrada em muitos tecidos, plasma e outros fluidos corporais. Eles são divididos em duas categorias, dependendo de sua especificidade e sensibilidade à acetilcolinesterase (truecolinesterase; AChE) e inibidores da butirilcolinesterase (pseudocolinesterase; BChE) (BEGUM et al., 2018). A acetilcolina é uma molécula chave que controla a consolidação da memória e o comportamento de aprendizagem da sobrevivência neuronal. O desequilíbrio

dos níveis de ACh devido a mudanças genéticas envolvidas na síntese, transporte e degradação leva à disfunção colinérgica (TRIVEDI et al., 2017).

Atualmente, devido à proximidade sistêmica da espécie com os humanos, vários organismos modelo para estudos de toxicidade *in vivo* estão sendo utilizados, como insetos (*Drosophila*), peixes e mamíferos (camundongos e ratos). (ANDERSEN; WINTER, 2019; ANHOLT, 2020; EOM et al., 2017). A *Drosophila Melanogaster*, conhecida como mosca da fruta tem muitas vantagens técnicas sobre os modelos de vertebrados, sendo fácil e mais econômico de cultivar em condições de laboratório. Possuem um ciclo de vida mais curto, podem produzir um grande número de embriões colocados externamente e podem ser geneticamente modificados de várias maneiras (JENNINGS, 2011). A *Drosophila Melanogaster* (DM) é um organismo modelo importante que pode ser usado para avaliar a toxicidade e os efeitos benéficos de várias substâncias químicas, incluindo aquelas derivadas de plantas.

Sendo assim, este estudo visa colaborar na ampliação dos conhecimentos a respeito dos efeitos da berberina, com a utilização do método de dispersão sólida para a produção de nanopartículas e toxicidade utilizando *Drosophila Melanogaster* como modelo biológico, na tentativa de melhorar as propriedades tecnológicas do bioativo mediante experimentos *in vivo* e *ex vivo*.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Produção de nanopartículas de berberina e avaliar a toxicidade em *Drosophila melanogaster* como um modelo biológico alternativo.

2.2 Objetivos Específicos

- Sintetizar as nanopartículas de berberina (NPs BBr) com o encapsulante Poloxamer 407 (P407) por meio da técnica dispersão sólida;
- Caracterizar as nanopartículas de berberina e a berberina (BBr) livre por diferentes técnicas: Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC) a fim de investigar o comportamento térmico da amostra; Espectrofotometria no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) para medir quão bem uma amostra consegue absorver radiação a um determinado comprimento de onda; Espectroscopia eletrônica no ultravioleta (UV-Vis);
- Caracterizar as NPs BBr pela técnica de Potencial zeta;
- Verificar a estabilidade química das NPs BBr e da BBr por meio de medidas de pH durante 60 dias;
- Avaliar a toxicidade *in vivo* da berberina em água (BBr água), berberina em etanol (BBr EtOH) e da nanopartícula de berberina (NPs BBr) usando a espécie *Drosophila Melanogaster* submetidas aos tratamentos (3 μ Mol; 10 μ Mol, 30 μ Mol e 100 μ Mol).

Nos seguintes experimentos: curva de sobrevivência e dose letal (DL50) e ensaios comportamentais, geotaxia negativa, base topo e campo aberto.

- Verificar a viabilidade celular (MTT) em *Drosophila melanogaster* submetidas aos tratamentos com
- Avaliar o efeito do consumo da dieta suplementada com BBr água, BBr EtOH NPs BBr utilizando corante alimentar azul brilhante (Brilliart Blue FCF) nas *Drosophila melanogaster*.
- Por fim, investigar por ensaios *ex vivo* enzimáticos, a atividade da acetilcolinesterase (AChE) e da butirilcolinesterase (BChE).

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Compostos Bioativos

Os compostos biologicamente ativos são antioxidantes naturais, benéficos para a prevenção e tratamento de doenças metabólicas, degenerativas e cardiovasculares. Estes compostos estão presentes em fontes vegetais como frutas, verduras, raízes e leguminosas (REZAUL et al., 2018). Os compostos bioativos podem ser óleos essenciais, flavonoides, fenólicos, carotenóides, taninos, terpenóides. Esses compostos derivados de plantas também estão presentes na indústria alimentícia, porém, existem restrições à aplicação no sistema alimentar devido à baixa absorção, baixa solubilidade em água, e perda da biodisponibilidade oral, o que os torna difíceis de serem adicionados à maioria dos alimentos. A eficácia de muitos extratos de plantas depende do fornecimento de compostos biologicamente ativos (CODEVILLA, 2015). A maioria dos compostos bioativos pertence a várias famílias, e cada uma possui características estruturais específicas, que são determinadas pela forma como são constituídos na natureza (J. AZMIR, 2013).

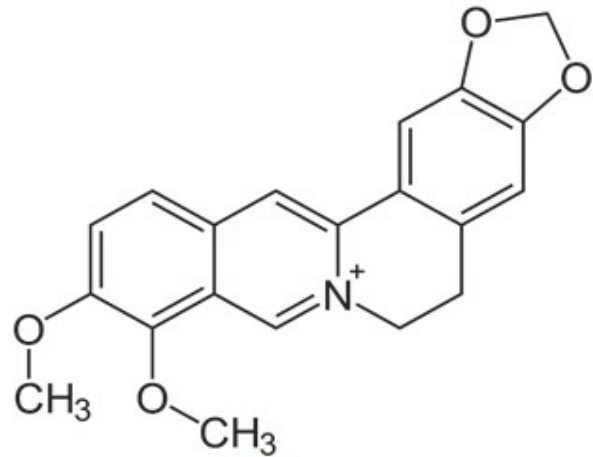
3.2 Atividades Biológicas Da Berberina (BBR)

A berberina é um alcaloide isoquinolínico do tipo protoberberina, de sabor amargo de flores amareladas e frutos vermelhos (2,3-metilenodioxo-9, 10-dimetoxiprotoberberina cloreto – BBR) Figura 1. É utilizado há pelo menos 3.000 anos na medicina alternativa indiana (ayurvédica) e chinesa e se faz presente em várias fórmulas na medicina japonesa e coreana. A berberina é encontrada nas raízes, rizomas e cascas do caule de muitas plantas, como *Coptis chinensis* (*coptis* ou fio de ouro), *Berberis aquifolium* (Uva Oregon) *Hydrastis canadensis* (goldenseal), *Berberis vulgaris* (Bérberis) e *Berberis aristata* (árvore do açafraão). Pode ser produzida por plantas de famílias *Berberidaceae*, *Menispermaceae*, *Ranunculaceae* e *Rutaceae* (AHMED et al., 2015; LU et al., 2015; PANDEY et al., 2018; WANG et al., 2018) A alta produção de berberina também pode ser alcançada através de modificações metabólicas nas plantas por engenharia genética (TANG et al., 2009).

Figura 1: Berberis vulgaris (A) e Estrutura química da berberina (B)



(A)



(B)

Fonte: (LI et al., 2019a; WANG et al., 2018)

A berberina (BBr) vem sendo estudada por diversos ensaios clínicos para o tratamento de doenças cardiovasculares, tumores colorretais com recorrência de adenoma, diabetes, endotelial com defeito no metabolismo da glicose / síndrome metabólica, infecção por *Helicobacter pylori*, hiperglicemia, hiperlipidemia, sensibilidade à insulina e secreção da insulina, inflamação, fígado gorduroso não alcoólico, agregação plaquetária, ovário policístico e esquizofrenia. (CAI, 2016; CHEN et al., 2014; MCCUBREY et al., 2017).

O uso da berberina foi aprovado pelo Food and Drug Administration (FDA) devido ao seu efeito significativo de antioxidante, a partir da eliminação de radicais livres, a capacidade de absorver e neutralizar os radicais livres, e eliminar o oxigênio reativo ou decompor peróxidos (JAVAD-MOUSAVI et al., 2016).

Em relação a toxicidade da berberina, estudos tem demonstrado que uma dose de até 20,8g de berberina/kg de peso corporal é segura para administração via oral em camundongos. Outros estudos realizados mostraram que o efeito curativo da berberina no corpo humano é de 1000 mg/kg por dia durante 3 meses, na dose de 500 mg/kg, 3 vezes ao dia (KHEIR et al., 2010; YIN; XING; YE, 2008). A berberina apresenta ação inibidora da acetilcolinesterase, semelhante a galactamina, uma droga que vem sendo utilizada no tratamento de doença de Alzheimer (INGKANINAN et al., 2006). Uma administração diária de berberina na dose de 50 mg/kg por via oral, durante 114 dias, foi eficaz na reversão do dano na memória espacial causado pelo peptídeo α , β -amiloide em modelo experimental de Alzheimer em ratos (ZHU; QIAN, 2006).

A berberina é um composto fortemente colorido que pode ser facilmente monitorado por espectroscopia de absorção por UV-Vis. Como fluoróforo, praticamente não é emissivo em água, mas sua fluorescência é restaurada nas fases lipídicas e mídia restrita (FERY-FORGUES, 2016). Uma estratégia para aumentar a solubilidade dos medicamentos é desenvolver uma preparação de dispersão sólida amorfa. A dispersão pode aumentar as propriedades termodinâmicas e diminuir barreira energética do que a forma cristalina da droga. Essa dispersão tem o potencial para melhorar a taxa de solubilidade e dissolução de um medicamento. Além disso, as preparações amorfas comprovadamente aumentam a biodisponibilidade dos medicamentos, aumentando sua solubilidade em saturação fluidos gastrointestinais (ZHAOJIE et al., 2014).

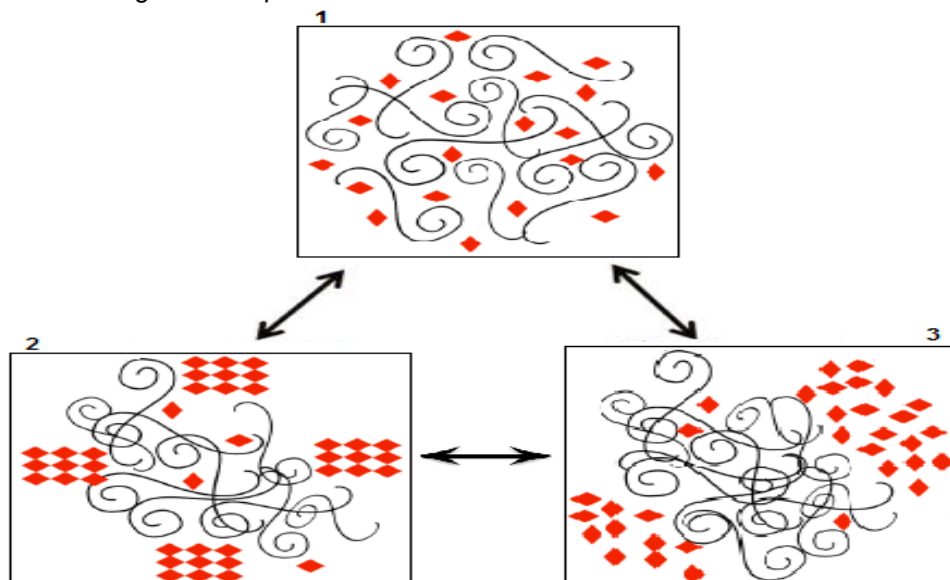
3.3 Dispersões Sólidas

Para melhorar a biodisponibilidade e eficácia clínica de drogas lipofílicas pouco solúveis em água, muitas técnicas têm sido usadas. Dentre vários métodos, o mais popular é a incorporação de fármacos em carreadores lipídicos inertes como óleos, dispersões de tensoativos, formulações autoemulsionantes (GERSHANIK; BENITA, 2000); polivinilpirrolidona (TANTISHAIYAKUL; KAEWNOPPARAT; INGKATAWORNWONG, 1999), o succinato de D- α -tocoferil polietilenoglicol-1000 (TPGS) mostrou uma série de benefícios, incluindo um aprimoramento da dissolução do fármaco (KIM et al., 2019), e a preparação de dispersões sólidas à base de complexos de inclusão de ciclodextrina, polietileno glicóis 4000 e 6000. Os excipientes de gelucires (glicéridos de polietileno glicol) têm sido utilizados na formulação de dispersões semi-sólidos (PATEL; PANCHAL; MEHTA, 2013).

A dispersão sólida, pode ser definida como uma dispersão, no estado sólido, de um fármaco em um ou mais carreadores inertes, que podem ser uma molécula pequena ou, mais frequentemente, um polímero cujo objetivo é de melhorar a taxa de dissolução, solubilidade e biodisponibilidade de medicamentos pouco solúveis. Usam veículos cristalinos e poliméricos, respectivamente, melhoram a solubilidade e a taxa de dissolução por tamanho de partícula redução, mudança de forma cristalina e melhoria da mobilidade (GURUNATH et al., 2013; HUANG; DAI, 2014; SHI et al., 2015; VO; PARK; LEE, 2013; ZHANG et al., 2014).

As dispersões sólidas, quando produzidas seguem três formas de dispersão (Figura 2); (1) forma ideal para se obter um bom resultado de dissolução é a forma, quando o fármaco (representado pela parte vermelha) e a matriz (representada pela parte preta) são bem uniformes e não possui aglomeração; (2) uma dispersão com fármaco cristalino, tendo pouca interação polímero/ fármaco e (3) onde as moléculas do fármaco se encontram bem juntas, dificultando a sua dissolução, apesar de formar um fármaco amorfo, o mesmo não tem boa interação com o polímero, indicando que pode acontecer uma separação de fase (HUANG; DAI, 2014).

Figura 2: Dispersões sólidas com visão micromolecular



Fonte: Modificado de (HUANG; DAI, 2014).

A dispersão de medicamentos pouco solúveis em água nos transportadores melhorará a solubilidade do medicamento enquanto polímeros insolúveis em água ou dilatáveis podem ser usados para retardar a liberação do fármaco na dissolução média. A dispersão sólida pode fornecer uma quantidade adequada de medicamento por um longo período de tempo e, portanto, oferecem muitas vantagens, dentre elas a melhor adesão do paciente devido à redução da frequência de dosagem, efeitos colaterais diminuídos, terapia mais constante ou prolongada, efeito pênico para medicamentos pouco solúveis em água. Os polímeros convencionais usados para retardar a liberação de medicamentos solúveis em água incluem etilcelulose, eudragit, poli (óxido de etileno) e polímero de carboxivinil (Carbopol) (SZUTS et al., 2011; VASCONCELOS; SARMENTO; COSTA, 2007; VO; PARK; LEE, 2013)

Para as dispersões sólidas fornecerem estabilidade amorfa aprimorada concentram-se no aumento da energia de ativação para a transformação, que é responsável através da redução da mobilidade molecular. Podem ser encontrados em sistemas farmacêuticos por dois métodos: interações específicas e confinamento. Interações específicas, medicamentos e materiais transportadores podem ser selecionados para explorar interações moleculares como a ligação de hidrogênio reduzindo a mobilidade (DINUNZIO et al., 2010; VAN DEN MOOTER, 2012). Confinamento, é quando o sistema é mantido a 50°C abaixo da temperatura de transição vítrea, o movimento molecular é minimizado (HANCOCK, 2001).

As dispersões sólidas possuem vantagens e desvantagens, dentre as vantagens, produzem partículas com tamanho reduzido, partículas com melhor molhabilidade, partículas com maior porosidade (VASCONCELOS; SARMENTO; COSTA, 2007). As desvantagens é que elas não são amplamente utilizadas em produtos comerciais, principalmente porque existe a possibilidade de que durante o processamento (estresse mecânico) ou armazenamento (estresse de temperatura e umidade) o estado amorfo possa sofrer cristalização (MOOTER et al., 2006; VASCONCELOS; SARMENTO; COSTA, 2007) Além disso, a maioria dos polímeros usados em dispersões sólidas pode absorver a umidade, o que pode resultar em separação de fases (WANG; MICHOEL; VAN DEN MOOTER, 2005).

Dependendo do estado físico do transportador que é cristalino ou amorfo, as dispersões sólidas são divididas em cristalinas amorfas, podem ser classificadas em quatro gerações com base em sua composição (Figura 3) (HUANG; DAI, 2014; VO; PARK; LEE, 2013).

Figura 3: Fluxograma ilustrando das gerações das dispersões sólidas



Fonte: Modificado de (VO; PARK; LEE, 2013)

3.3.1 Dispersões sólidas de primeira geração

A primeira geração é a pioneira no processo de dispersão sólida, método que consiste nas misturas eutéticas que melhora a taxa de liberação do fármaco e, conseqüentemente, a biodisponibilidade de fármacos fracamente solúveis em água. As melhorias observadas foram atribuídas a uma dissolução mais rápida do transportador, liberando micro cristais ou partículas de medicamento. Os portadores cristalinos incluem ureia e açúcares (sorbitol e manitol), que foram os primeiros transportadores a serem empregados em dispersões sólidas. Nesse tipo de dispersão sólida o fármaco cristalino é disperso em um carreador cristalino, formando uma mistura eutética ou monotética. Na mistura eutética, o ponto de fusão da mistura é menor que o ponto de fusão do fármaco e do carreador, enquanto que na mistura monotética o ponto de fusão do carreador e do fármaco são constantes (SZUTS et al., 2011; VASCONCELOS; SARMENTO; COSTA, 2007; VO; PARK; LEE, 2013).

3.3.2 Dispersões sólidas de segunda geração

Devido as desvantagens apresentadas pelas primeiras dispersões sólidas desenvolvidas, surgiu a segunda geração utilizando carreadores amorfos, os quais são majoritariamente polímeros (HUANG; DAI, 2014; VASCONCELOS; SARMENTO; COSTA, 2007; VO; PARK; LEE, 2013). Nas dispersões sólidas de segunda geração, as partículas de fármaco normalmente estão amorfas, no entanto, em alguns casos o fármaco pode estar dissolvido ou suspenso no carreador, existindo nos estados amorfo e cristalino ao mesmo tempo (VASCONCELOS; SARMENTO; COSTA, 2007; VO; PARK; LEE, 2013). Os polímeros empregados nas dispersões sólidas de segunda geração podem ser sintéticos, como os polietilenoglicóis (PEG); polivinilpirrolidona (PVP), e os polimetacrilatos, ou polímeros de origem natural, por exemplo, derivados da celulose, como etilcelulose, hidroxipropilmetilcelulose (HPMC), hidroxipropilcelulose, derivados do amido e ciclodextrinas (HUANG; DAI, 2014; MOTALLAE; TAHERI; HOMAYOUNI, 2018; XU et al., 2019).

3.3.3 Dispersões sólidas de terceira geração

Na terceira geração foram propostas novas alternativas, como o uso de matrizes contendo misturas de tensoativos, auto-emulsionantes ou agentes de inclusão/complexação como carreadores ou aditivos. Estas previnem algumas desvantagens da segunda geração, tais como cristalização da dispersão durante o armazenamento ou precipitação de fármaco *in vivo* por supersaturação em meio de dissolução (VASCONCELOS; SARMENTO; COSTA, 2007; VO; PARK; LEE, 2013). A terceira geração veio com a finalidade de minimizar os problemas decorrentes da precipitação do fármaco observados na dispersão sólida de primeira e segunda geração. Essas interferências são resultantes da ocorrência da recristalização do fármaco a partir do estado amorfo no processo de preparo e durante a estocagem (HUANG; DAI, 2014; VO; PARK; LEE, 2013). O uso de tensoativos podem prevenir a aglomeração e nucleação do fármaco na matriz, melhorando a estabilidade física e química durante a preparação (KIM et al., 2011).

Existem vários tensoativos utilizados na dispersão sólida que se mostraram efetivos no aumento da biodisponibilidade de fármacos, dentre eles, Poloxamer 407 (MEDAREVIĆ et al., 2016), Inutec SPI (XU et al., 2016), inulina, Compritol 888 ATO, Gelucire 44/14 (VO; PARK; LEE, 2013). E também existe outros tensoativos e emulsionantes que vem sendo utilizados como aditivos nas dispersões sólidas como polissorbato 80, laurel sulfato de sódio, d-alfa tocoferol, óleo de rícino hidrogenado de polioxietileno, succinato de polietilenoglicol 1000 (ALSHAHRANI et al., 2015), laurato de sacarose (VO; PARK; LEE, 2013). Trabalhos mostram que na dispersão sólida, a utilização de adjuvantes (ativadores) na sua formulação foi benéfica, pois houve um aumento significativo no seu perfil de dissolução, uma melhor molhabilidade, dando assim mais estabilidade a dispersão e diminuindo o percentual de precipitação e recristalização. É importante escolher um tensoativo correto evitando assim que ocorra o efeito contrário aumentando a recristalização (CHAUDHARI; DUGAR, 2017).

3.3.4 Dispersões sólidas de quarta geração

A dispersão de quarta geração consiste em sistemas de liberação prolongada bifuncionais (átomos) por natureza e têm propriedades de solubilização, tais como o de surfactante. Os fármacos utilizados na quarta geração apresentam baixa solubilidade em água e tempo de meia-vida plasmática curto. A solubilidade é independente das mudanças no pH, que torna essas transportadoras excelentes opções para o desenvolvimento de dispersões sólidas (GURUNATH et al., 2013; KHAN et al., 2014; VO; PARK; LEE, 2013).

Este tipo de dispersão possui vantagens que incluem a melhoria da adesão ao tratamento pelo paciente, devido à dosagem reduzida, a diminuição de efeitos colaterais e a duração prolongada do efeito terapêutico. Alguns polímeros são utilizados para retardar a liberação de fármacos nas dispersões sólidas de quarta geração, dentre eles a hidroxipropilcelulose, eudragit, acetato de celulose, polímero carboxivinílico (Carbopol) e poli (óxido de etileno) (VO; PARK; LEE, 2013).

3.5 Polímeros

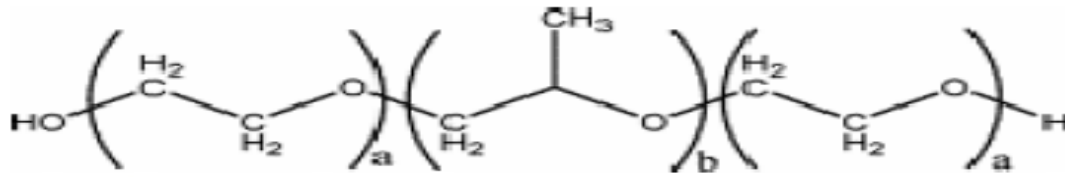
Os materiais poliméricos são amplamente usados em todo o mundo principalmente devido às suas propriedades superiores, como resistência química, alta resistência corrosiva, alta temperatura, não condutividade, alta clareza, reprocessabilidade. A presença de materiais poliméricos em nosso dia a dia tem aumentado significativamente desde a década de 1960 e hoje esses materiais estão presentes em quase tudo o que se consome.

Os polímeros são moléculas de cadeia longa e geralmente de alta massa molar, e devido ao seu tamanho são chamadas de macromoléculas (MÜLHAUPT, 2013). Para o uso adequado de polímeros é muito importante conhecer as propriedades desses materiais, tais como temperatura de fusão, grau de cristalinidade, pureza, transição vítrea. Para obter tais propriedades é necessário o uso de muitas técnicas, inclusive das técnicas termoanalíticas. O estudo da aplicação dessas técnicas vem aumentando muito principalmente devido as propriedades químicas e físicas de polímeros, tendo em vista a precisão e rapidez, bem como o número de informações que estas técnicas possibilitam (ABEYKOON et al., 2014; BANNACH et al., 2011).

3.5.1 Poloxamer

Os polímeros são matérias-primas que reúnem propriedades tecnologicamente viáveis e interessantes para otimizar a dissolução de fármacos poucos solúveis. O poloxamer 407 tem se tornado objetivo de pesquisa em vários campos da biologia celular, imunologia e oncologia. (PATEL; PATEL; PATEL, 2009). Os poloxamer é uma família de copolímeros em tribloco, apresentando um bloco central de óxido de polipropileno hidrofóbico (PPO) com dois blocos de polietileno hidrofílico (PEO) nos flancos (Figura 4) (BOONLAI et al., 2017; MANAGA et al., 2018; PEREIRA, G. G, KECHINSKI, 2013). Existem comercialmente disponível mais de 30 tipos de poloxamer com uma ampla gama de composição e pesos moleculares que variam no intervalo de 1.100 - 14.000 Da, sendo o poloxamer 407 um dos mais estudado na literatura (CARAMELLA et al., 2015; KLOUDA, 2015).

Figura 4: Estruturas químicas do (a) poli (etileno glicol) (PEG) e (b) Poloxamer 407



Fonte: (PATEL; PATEL; PATEL, 2009).

Em meio a família de copolímeros, o Poloxamer 407 foi registrado como marca comercial Pluronic® F127 pelos Laboratórios BASF Care Chemicals e como Synperonic PE/F127® pelos Laboratórios ICP. Também foi aprovado como um produto farmacêutico, um dos hidrofílicos não-iônicos com uma vasta gama de aplicações (FAKHARI; CORCORAN; SCHWARZ, 2017; KUROIWA et al., 2018). O Poloxamer® F127 é reconhecido como um “componente inativo” para diversos produtos para saúde humana e animal, como soluções orais, suspensões, formulações por inalação, intravenosas, oftálmicas ou tópicas (FAKHARI; CORCORAN; SCHWARZ, 2017).

Atualmente, os fármacos tiveram um aumento considerável da solubilidade e da velocidade de dissolução com o uso de polímeros com propriedades tensoativas, de terceira geração, como o poloxamer, que não somente aumenta a molhabilidade de fármacos hidrofóbicos, como também auxilia a dissolução pelo mecanismo da solubilização micelar. O uso de tensoativos como carreadores pode conceder ao sistema a vantagem de inibição da recristalização do fármaco (ELOY et al., 2012). Devido as suas propriedades de termo-gelificação, o Poloxamer 407 tem sido amplamente investigado para aplicações biomédicas (BOONLAI et al., 2017).

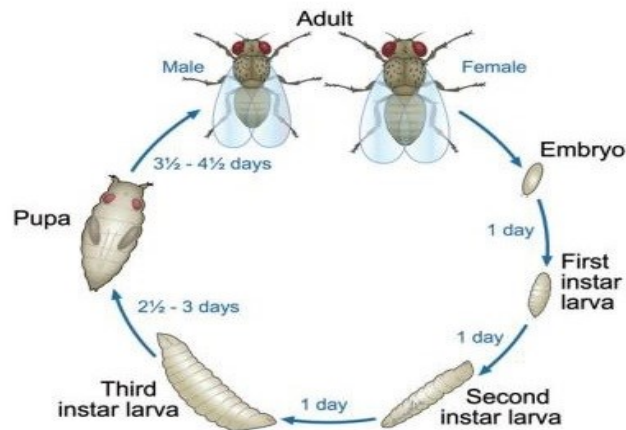
O polímero é solúvel em água fria (4 - 5°C) e solução aquosa, e apresenta transição gel (6 - 8°C) com aquecimento. A uma temperatura mais baixa em solução aquosa, uma camada de hidratação envolve moléculas de Poloxamer 407 responsável por sua solubilidade a frio, mas com o aumento da temperatura, as cadeias de copolímeros hidrofílicos tornam-se dessolvatadas que favorecem interações hidrofóbicas entre unidades de polioxipropileno e conduzem a formação de gel (BOONLAI et al., 2017; DEWAN et al., 2015; KUROIWA et al., 2018).

3.6 *Drosophila melanogaster*

A família Drosophilidae é um grande grupo da ordem Diptera e classe Insecta, inclui pelo menos 4.200 espécies, quase em todo o mundo, distribuídas nos mais diferentes tipos de ambientes. Nessa família, encontram-se 1.180 espécies de drosophila, a mais diversa e pesquisada (RAND, 2010; SHARMA et al., 2011; VILELA; MORI, 2014).

Entre os drosofilídeos, a mais conhecida é a espécie *Drosophila Melanogaster* (Carl von Linné)(DM), conhecida comumente como mosca da fruta, apresenta uma série de características que a tornam um modelo alternativo excelente para estudos toxicológicos. Dentre estas características, incluem-se seu pequeno tamanho, ciclo de vida curto (representado na Figura 5), fácil manipulação, tamanho reduzido, dimorfismo sexual, e similaridade de genes envolvidos com doenças em mamíferos (PANDEY; NICHOLS, 2011; PAULA et al., 2014).

Figura 5: Ciclo de vida das *Drosophila melanogaster*



Fonte: (ONG et al., 2015)

A *Drosophila melanogaster* tem uma reprodução que produz centenas de descendentes dentro de 10 a 12 dias sob condições ideais (25°C e 60% umidade), permitindo a realização de pesquisas em várias gerações em pequeno espaço de tempo (BELLEN; TONG; TSUDA, 2010; O'KANE, 2011; PRÜSSING; VOIGT; SCHULZ, 2013). Além disso, esse modelo oferece ferramentas poderosas que podem ser usadas para desviar geneticamente comportamentos complexos, comportamentos olfativos em relação a fontes alimentares, parceiros de acasalamento e prevenção de predadores, parasitas e

microorganismos nocivos que são impulsionadores especialmente importantes da evolução comportamental (ANHOLT, 2020).

As drosophilas também exibem comportamentos complexos, muitos dos quais sofrem declínio relacionado à idade. As moscas exibem várias formas de comportamento, e a robustez de comportamento diminui com a idade e a escalada vertical (ou geotaxia negativa) uma avaliação da capacidade do animal de concluir uma atividade (escalada contra a gravidade, que fornece informações sobre o nível de condicionamento da mosca) (NAVROTSKAYA et al., 2012). Um comportamento crítico para a sobrevivência das espécies na maioria dos insetos é o local onde depositar os ovos (oviposição). Como as larvas não podem voar e geralmente permanecem próximas ao local da oviposição, sua capacidade de sobreviver depende muito da quantidade de comida no qual elas eclodem (CHIN et al., 2018). Assim, uma mosca fêmea (Figura 6) acasalada deve equilibrar suas próprias necessidades nutricionais e de segurança com as necessidades de sua prole futura, para minimizar a ingestão de nutrientes e a proteção contra parasitas e microorganismos causadores de doenças (CHEN; AMREIN, 2017; CHIN et al., 2018). Esses organismos têm sido muito utilizados como modelo biológico para testes de toxicidade de praguicidas (NARCISO; NAKAGAWA, 2009) no potencial tóxico-genético dos larvicidas dilapiol e espinosade (ACIOLE et al., 2014), ensino de genética (ROCHA et al., 2013) e em tantos outros estudos (RAND, 2010; SHARMA et al., 2011).

Figura 6: *Drosophila melanogaster* fêmea



Fonte: (ROCHA et al., 2013)

Assim, a DM considerada como organismo alternativo em pesquisa científica, pois levanta poucas preocupações éticas e vem sendo recomendada pelo Centro Europeu de

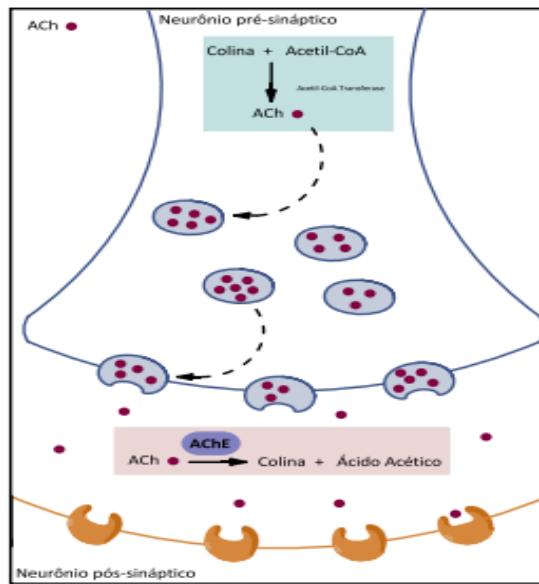
Validação de Métodos Alternativos – ECVAM, com o intuito de minimizar o número de mamíferos, como ratos e camundongos, em testes toxicológicos, solucionando impasses envolvendo questões da bioética (CARMICHAEL; LOCKHART, 2012; DOKE; DHAWALE, 2015; TICKOO; RUSSELL, 2002).

3.7 Sistema Colinérgico

O sistema colinérgico regula vários aspectos da função cerebral, incluindo o processamento sensorial, sono, atenção, memória, aprendizagem, e excitação, bem como a modulação da atividade neural via receptores de acetilcolina (JIANG; GAO; TURDU, 2017; LI et al., 2017b).

As colinesterases podem ser encontradas em dois tipos: (AChE, E.C.3.1.1.7) que se encontra abundantemente no sistema nervoso central, nos músculos esqueléticos e na membrana dos eritrócitos. A butirilcolinesterase (BChE, E.C.3.1.1.8) conhecida por colinesterase plasmática devido estar presente em sua maioria no plasma sanguíneo e a acetilcolinesterase. Apesar destas colinesterases serem semelhantes em suas estruturas, elas diferenciam-se por sua distribuição nos tecidos, propriedades cinéticas e pela especificidade para com seus substratos. A ACh é considerada um neurotransmissor que participa das sinapses colinérgicas nos sistemas nervoso central (SNC) e periférico (SNP) (ARAÚJO; SANTOS; GONSALVES, 2016) Figura 7. A acetilcolinesterase (AChE) e butirilcolinesterase (BChE) apresentam estruturas semelhantes, sendo que seus aminoácidos apresentam aproximadamente 50% de homologia (semelhança de origem e estrutura entre órgãos ou partes de organismos diversos) e os outros 50% de heterogenia (alternâncias de gerações) entre os aminoácidos são responsáveis pelas diferenças de seletividade tanto dos substratos quanto dos inibidores destas enzimas (ARAÚJO; SANTOS; GONSALVES, 2016; N. GOULART et al., 2020).

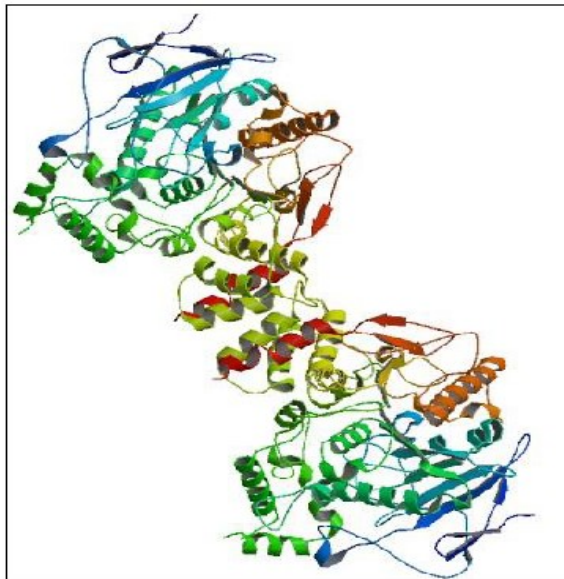
Figura 7: Sinapse colinérgica na atividade da AChE



Fonte: (ARAÚJO; SANTOS; GONSALVES, 2016).

A AChE é uma enzima acetilcolina hidrolase com atividade de esterase e está presente nas sinapses colinérgicas e junções neuromusculares em vertebrados e invertebrados. Localiza-se principalmente no lacunas sinápticas do sistema nervoso central (SNC) e periférico (SNP) (KIM; LEE, 2018) Figura 8.

Figura 8: Estrutura da AChE da *Drosophila melanogaster*



Fonte: (DE SÁ, 2019)

A enzima BChE é produzida no fígado e liberada na circulação sistêmica. A BChE também pode ser produzida em menor escala no cérebro, onde apesar de ter seu substrato original (butirilcolina) (LI et al., 2017a). A BChE tem propriedade de hidrolisar ésteres bioativos, essa característica torna possível ao ser humano obter nutrientes das plantas, pois uma falha na hidrólise de alguns ésteres endógenos poderia torná-lo tóxico ao organismo (POPE, C. N.; BRIMIJOIN, 2018).

A relatos de que a BChE pode estar envolvida na doença do Alzheimer. Foram realizados alguns estudos na busca por inibidores seletivos de BChE, que pudessem aumentar os níveis de ACh nas sinapses cerebrais para transmissão e cognição colinérgica. Por mais que os efeitos dos inibidores se demonstraram positivos trazendo melhora na função cognitiva e aumentando a memória em curto prazo, esses efeitos foram temporários, apresentando um melhor efeito no início da doença, sem cura (LI et al., 2017b; POPE, C. N.; BRIMIJOIN, 2018).

3.7.1 Estresse oxidativo

As glutathione S-transferases (GST) são enzimas que estão envolvidas na detoxificação de toxinas químicas presentes no organismo, como as espécies reativas de oxigênio (EROs), são de suma importância para as células por participarem de muitos processos bioquímicos. Mas se apresentar em alta concentração pode levar ao estresse oxidativo, causando danos severos a célula levando a morte (YANG et al., 2015; ZHANG et al., 2016). As espécies reativas de oxigênio (EROs) são substâncias tóxicas que possui um ou mais átomos de oxigênio ativo, resultantes da redução do oxigênio (ARAÚJO et al., 2018).

Além de todo o estresse oxidativo, a redução da glutathione reduzida pode causar neurodegeneração no caso da redução acentuada nos níveis de GSH no cérebro, especificamente na substância *nigra pars compacta* (SNpc). Esse é o primeiro passo para desencadear a neurodegeneração, que precede o estresse oxidativo e o mal de Parkinson. Sendo assim, a restauração dos níveis de GSH celular pode impedir o início da doença (HARISH et al., 2010).

4 MATERIAL E MÉTODOS

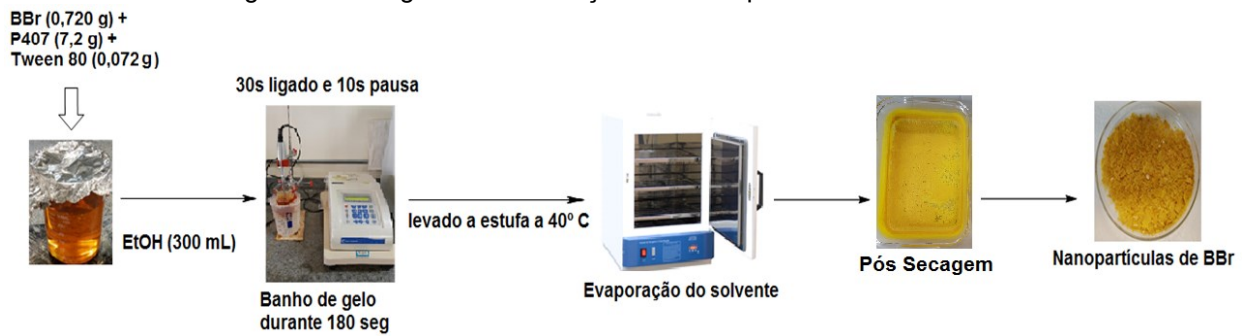
4.1 Material

Os reagentes necessários para meio de cultura das *Drosophila melanogaster* foram adquiridos no comércio local (sacarose, leite em pó, farinha de milho, fermento biológico) da cidade de Campo Mourão – PR, exceto o metilparabeno (Nipagin P.A) que foi adquirido na Dinâmica, usado com antifúngico. Para extração e encapsulação foram utilizados álcool etílico absoluto P.A. (NEON, 99,8%), o composto Cloreto de berberina (90 % de pureza, Sigma-Aldrich) o polímero Kolliphor® Poloxamer 407 (massa molar de $12.220 \text{ g/mol}^{-1}$, Sigma-Aldrich) Tween 80 P.S. (Polissorbato) (Dinâmica). Para os demais experimentos foram utilizados Brometo de Potássio Espectroscópico (KBR) (Vetec), Agar (Sigma-Aldrich) Brilliant Blue FCF (Sigma-Aldrich), e os demais reagentes adquiridos de outros fornecedores (Alfa Aesar, Neon). Os reagentes usados para os ensaios enzimáticos *ex vivo* foram o Iodeto de Acetilcolina (99%, Sigma-Aldrich) para o teste com enzima acetilcolinesterase (AChE) e Iodeto de Butirilcolina (Sigma-Aldrich) para o teste com butirilcolinesterase (BChE), reagente 5,5'-ditiobis (2-nitrobenzóico) (DTNB) (98%, Sigma-Aldrich).

4.2 Nanoencapsulação da berberina

As nanopartículas foram produzidas de acordo com o procedimento descrito previamente por (LEIMANN et al., 2015) com algumas modificações representado na Figura 9. Para a encapsulação foi adicionado a berberina livre (0,720 g), o Poloxamer 407 (7,2 g), o Tween 80 (0,072 g) em álcool etílico absoluto no volume de 300 mL, então foram homogeneizados sob leve agitação magnética por 15 minutos. Em seguida, a miniemulsificação foi realizada em um banho de gelo usando o tempo de sonicação de 180s, amplitude de 100%, em um regime de pulsos (30s sonicação, 10s pausa) usando um equipamento sonicador Fisher-Scientific – UltrasonicDismembrator 120 W com ponteira de 1/8". Então, a miniemulsão foi transferida para recipientes de vidro e levado a estufa a 40°C mantida durante a noite para evaporação completa do etanol. Após secagem, o sólido resultante na cor amarela foi armazenado em recipiente de vidro protegido da luz (-10°C) caracterizado.

Figura 9: Fluxograma da obtenção das nanopartículas da Berberina



Fonte: Autoria própria (2021)

4.3 Caracterização das amostras

As nanopartículas de berberina (NPs BBr), a mistura física (MF) (Cloreto de berberina + Poloxamer 407), berberina livre (BBr Livre), Poloxamer 407 (P407) foram caracterizadas pelos métodos descritos a seguir.

4.3.1 Análise de estabilidade por calorimetria diferencial de varredura (DSC)

As análises térmicas foram realizadas em um calorímetro diferencial de varredura (DSC 4000, Perkin Elmer) acoplado à um banho de arrefecimento (9100, Polyscience). A coleta e tratamento de dados foram realizadas pelos softwares Pyris – InstrumentManaging e OriginPro8 (OriginLab). As amostras foram pesadas (7,4 g) em balança de precisão analítica e submetidas a ensaios isotérmico e não isotérmico. Assim, as mesmas foram colocadas em porta amostra de alumínio fechado com prensa e levado ao forno, junto colocou-se uma porta amostra vazio para referência e ambos aquecidos de 0 a 400°C com taxa de aquecimento de 10°C.min⁻¹ com fluxo de nitrogênio de 50 mL.min⁻¹. A Figura 10 representa o equipamento usado na caracterização.

Figura 10: Forno DSC



Fonte: Autoria própria (2021)

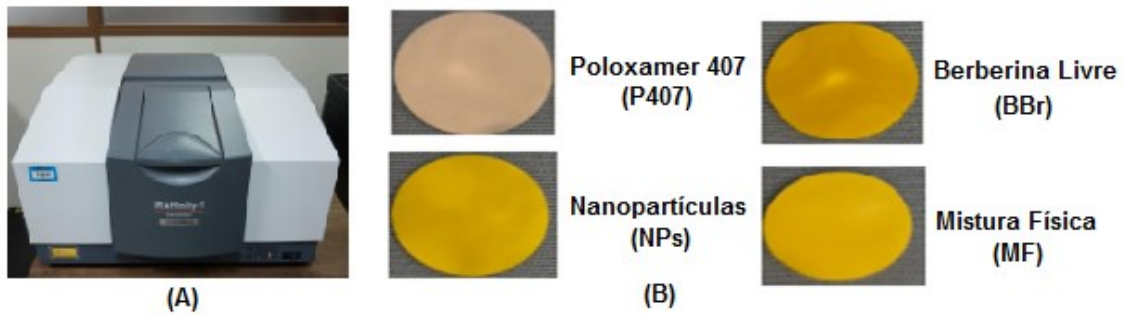
Para a realização dos cálculos considerando a entalpia envolvida na amostra e os valores obtidos no gráfico foram calculados o grau de cristalinidade (X_c %), a partir dos valores de $\Delta H_{100\%}$ (entalpia de fusão), ΔH_m (entalpia de fusão experimental em J/g^{-1}), e a transição vítrea (T_g).

4.3.2 Espectroscopia de infravermelho com transformada de fourier (FTIR)

Para as análises de Infravermelho com Transformada de Fourier (Shimadzu, modelo IRAffinity-1) (FTIR) foram utilizados cerca de 10 mg de amostra para a produção das pastilhas de brometo de potássio (KBR). A resolução usada foi de 4cm^{-1} , intervalo de número de ondas de 4000 cm^{-1} a 400 cm^{-1} , obtendo valores de varredura médios de 32 acumulações, realizando a normalização dos picos em relação ao pico de maior intensidade. Antes das medidas das amostras foi medido o espectro de infravermelho chamado “branco” empregando o cristal sem amostra.

Na Figura 11 estão apresentadas o equipamento de FTIR (A), pastilhas de P407 (B), BBr Livre, NPs BBr (B), MF (B).

Figura 11: Aparelho de FTIR (A) e pastilhas de brometo de potássio (KBr) (B)



Fonte: Autoria própria (2021)

4.3.3 Espectroscopia eletrônica na região do UV-VIS

As amostras BBr Livre, P407 e NP's BBr foram analisados na região do UV-Vis por espectrofotômetro portátil de fibra Red Tibe USB650 UV (Figura 12), utilizando cubetas de quartzo com caminho óptico de 1 cm. Para a BBr Livre foi preparado uma solução estoque de $1 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ ou $74,2 \mu\text{g.mL}^{-1}$ em água destilada e foram realizadas medidas sucessivas de absorbância em um determinado comprimento de onda para soluções em diferentes concentrações. Para a NPs BBr foi preparada uma solução estoque de $360 \mu\text{g.mL}^{-1}$ em água destilada. A aquisição dos espectros foi realizada na região de 190 a 1000 nm.

Figura 12: Espectrofotômetro portátil de fibra



Fonte: Autoria própria (2021)

4.3.4 Determinação do valor pH das NPs Berberina

Com o intuito de verificar a estabilidade química da formulação da NPs BBr foram realizadas medidas de pH por aproximadamente 60 dias. Foram preparadas duas soluções de NPs BBr na concentração de $37 \mu\text{g.mL}^{-1}$, uma foi armazenada em frasco âmbar e outra foi exposta a luz em temperatura ambiente, além de verificar o pH o objetivo foi analisar a estabilidade frente a luz. De forma similar foi realizado para a BBr Livre para verificar o comportamento do bioativo livre, nas concentrações de $37\mu\text{g.mL}^{-1}$. Na literatura muitos compostos bioativos fotoquímicos, assim foi necessário investigar o bioativo em estudo. O potenciômetro marca GEHAKA pHmetro PG2000 (Figura 13), foi calibrado com soluções tampão padrão em pH 7,0 e 4,0, em seguida, o eletrodo foi inserido diretamente em cada uma das soluções de NPs BBr/BBr Livre (exposta a luz ou armazenada em frasco âmbar) e anotado o valor em triplicata para cada solução semanalmente.

Além da verificação do pH em 60 dias, também foi realizado uma leitura no espectrofotômetro portátil no tempo=0 e no tempo=60 dias. Assim, foi possível comparar os espectros de UV-Vis da BBr livre (luz/âmbar) e da NPs BBr (luz/âmbar).

Os valores estão representados como média \pm desvio padrão das medidas realizadas em triplicata.

Figura 13: pHmetro PG2000.



Fonte: Autoria própria (2021)

4.3.5 Espalhamento de luz dinâmico (DLS) e potencial zeta da nanopartículas de berberina (NPs Berberina)

Para a realização da análise potencial zeta da nanopartícula de berberina foi utilizado 10,62 mg de amostra diluído em 10 mL de solução de KCl (1 mM) com um índice de refração 1,334). A concentração final da amostra foi de 1 mg mL⁻¹. Para a análise no DLS e potencial zeta, foi realizada uma diluição na proporção de 1:25 (v v⁻¹) tanto para amostra sem filtração como para a amostra filtrada em membrana de éster de celulose com diâmetro de poro de 3 µm, em seguida a amostra foi colocada em banho de ultrassom por 30 segundos.

A análise de espalhamento de luz dinâmico (DLS) foi realizado utilizando um ângulo de 173° e temperatura a 25°C. Os dados foram analisados utilizando o software do equipamento: Zetasizer Nano Series ZS modelo ZEN3600 do fabricante Malvern Instruments and PANalytical (Egham, Surrey, United Kingdom). Os valores estão representados como média ± desvio padrão da média das medidas realizadas em triplicata.

4.4 Ensaios biológicos

Para os ensaios biológicos foram utilizadas a mosca da fruta, cientificamente *Drosophila Melanogaster* (linhagem Harwich), adultas de ambos os gêneros (1-2 dias de idade), mantidas em frascos de vidro na incubadora BOD, sob condições controladas de luz (claro/escuro de 12 horas) a 25 ± 1°C e 50 % de umidade.

4.4.1 Ensaio *in vivo*

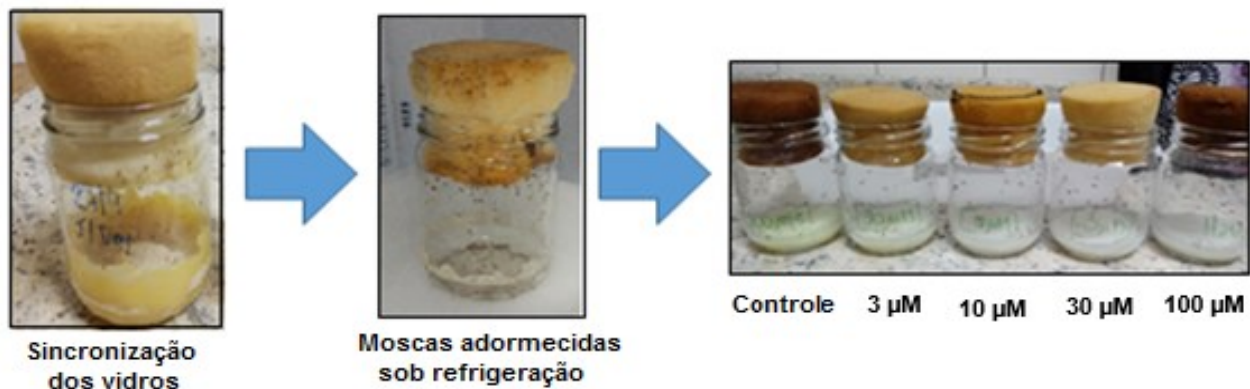
4.4.1.1 Taxa de sobrevivência/mortalidade

A taxa de sobrevivência foi realizada para berberina livre em água (BBr Livre), berberina livre em etanol (BBr Livre_EtOH) e nanopartículas de BBr (NPs BBr).

Para realizar o experimento foi necessário sincronizar os frascos com maior número de larvas, sendo que todas as moscas vivas foram retiradas restando apenas as larvas dentro dos frascos. Após 2 ou 3 dias, as larvas começaram a eclodirem e após mais dois dias as moscas jovens tornaram-se adultas e assim utilizamos para o teste. Em seguida as

moscas foram adormecidas sob refrigeração, e foram transferidas 100 moscas (ambos os sexos) para o meio de análise (Figura 14). O mesmo foi previamente preparado (1% de ágar; 1% de levedura; 0,05% de sacarose; 1% de leite em pó; 0,08% de metilparabeno) usando concentrações diferentes estabelecidas a partir de outros estudos e também por segurança (3; 10; 30; 100 μ M) de NPs BBr / BBr Livre Água / BBr Livre_EtOH (adicionados no ágar) e grupo controle das amostras (sem adição de substância). Quando o ensaio foi realizado com BBr Livre em água ou NPs BBr, o controle usado foi água e quando o ensaio foi realizado com BBr Livre_EtOH, o controle usado foi o etanol.

Figura 14: Esquema ilustrativo do teste *in vivo*



Fonte: Autoria própria (2021)

A taxa de sobrevivência foi avaliada pela contagem diária do número de moscas vivas até o final do período experimental 5 dias (N=5) e comparadas com o grupo controle.

4.4.1.2 Geotaxia negativa

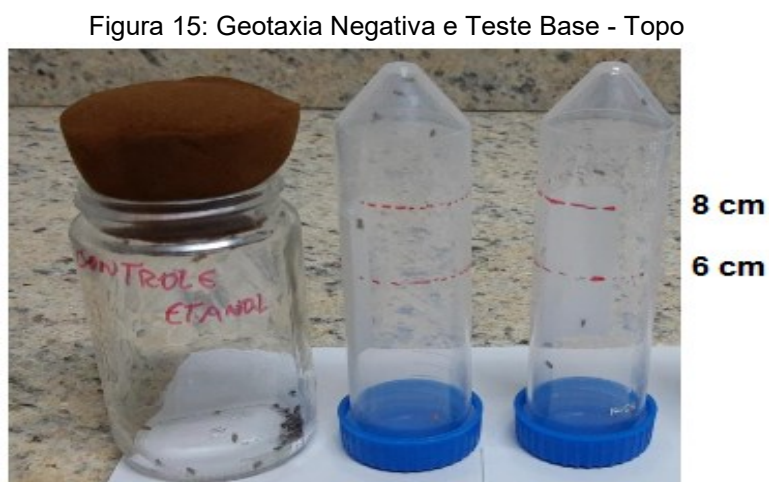
A geotaxia negativa das moscas foi determinada de acordo com (JIMENEZ-DEL-RIO; GUZMAN-MARTINEZ; VELEZ-PARDO, 2010). Foram preparados frascos do tipo Falcon (15 cm de comprimento e 1,5 cm de diâmetro) e foram realizadas marcações de 8 cm da base do frasco até atingir as marcações. Na sequência 10 moscas (ambos os sexos) de cada tratamento, foram anestesiadas sob refrigeração e então foram transferidas para os tubos do tipo Falcon. Após 30 minutos, período para a recuperação das *Drosophila Melanogaster* (DM), expostas a refrigeração, foi realizada uma batida suave na parte inferior do tubo para que as moscas fossem deslocadas para o fundo do tubo e, a partir daí, o

tempo gasto por cada mosca para se deslocar para a parte superior do tubo e atingir uma altura de 8 cm foi cronometrada. O procedimento foi repetido 5 vezes por cada grupo em intervalos de 1 minuto. O procedimento foi repetido 5 vezes por cada grupo em intervalos de 1 minuto. Esta análise foi realizada em moscas suplementadas com controle, NPs BBr, BBr Livre água e BBr Livre_EtOH nas doses finais de 3; 10; 30; 100 μ M.

4.4.1.3 Teste base – topo

A atividade locomotora das moscas foi determinada conforme o teste de base-topo descrita por (COULOM; BIRMAN, 2004). Após o final do período de 5 dias de exposição à diferentes doses (3; 10; 30; 100 μ M), 10 moscas (de ambos os gêneros) receberam uma breve anestesia sob refrigeração e então foram transferidas para um tubo do tipo Falcon de 15 mL (15 cm de comprimento e 1,5 cm de diâmetro) e foi realizada marcações de 6 cm da base do frasco até atingir 6 cm. Depois de 30 minutos de recuperação da anestesia, as moscas foram suavemente batidas para parte inferior do tubo, e o número de moscas que subiram a marca de 6 cm da coluna em 5 segundos, bem como aquelas que ficaram abaixo da marca foram contados separadamente. O procedimento foi repetido 5 vezes por grupo em intervalos de 1 minuto. Esta análise foi realizada em moscas suplementadas com controle, contendo NPs BBr, BBr Livre e BBr Livre_EtOH (3; 10; 30; 100 μ M).

Na Figura 15 estão representados os ensaios realizados de geotaxia negativa (8 cm) e teste base – topo (6 cm).

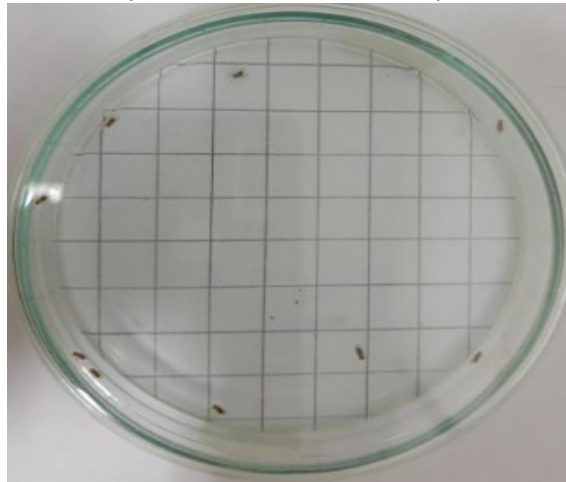


Fonte: Autoria própria (2021)

4.4.1.4 Teste de campo aberto

Para avaliar o comportamento e a atividade exploratória das moscas, 10 moscas de cada grupo foram mantidas em uma placa de petri a qual foi dividida em quadrantes de um centímetro quadrado cada (HIRTH, 2012), conforme a Figura 16. A atividade e o movimento das moscas foram filmados e avaliados a trajetória resultante para o tempo de 60 s, calculadas de acordo com o número de quadrados cruzados/explorados por cada mosca analisada em cada grupo. Esta análise foi realizada em moscas suplementadas com controle, NPs BBr, BBr Livre e BBr Livre_EtOH nas doses finais de 3; 10; 30; 100 μ M. O procedimento foi repetido 5 vezes por grupo em intervalos de 1 minuto.

Figura 16: Avaliação do comportamento e atividade exploratória das moscas



Fonte: Autoria própria (2021)

4.4.2 Ensaio *ex vivo*

4.4.2.1 Homogeneização pós taxa de sobrevivência/análises biológicas

Após realizado os testes *in vivo*, foram separadas as moscas sobreviventes por grupo sendo essas sensibilizadas em refrigerador doméstico (4°C), homogeneizadas manualmente em Tris-HCl (50 mM, pH 7,4) (1:10 mosca/ μ L tampão), centrifugadas a 6.000 rpm por 10 minutos, tomada uma alíquota do sobrenadante (S1) de cada grupo e então armazenada em ultrafreezer vertical (- 80° C) até as análises. As amostras

homogeneizadas foram de moscas suplementadas com controle, NPs BBr, BBr Livre e BBr Livre_EtOH (3; 10; 30; 100 μM).

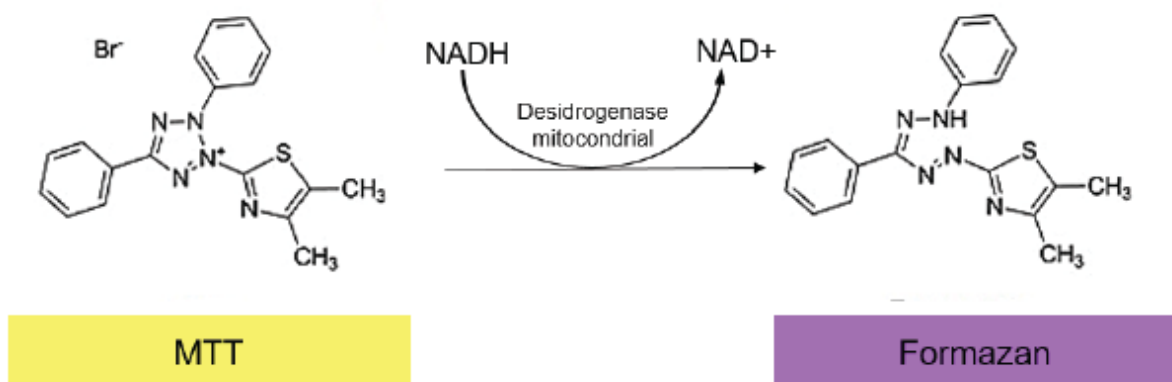
4.4.2.2 Avaliação de citotoxicidade celular

O ensaio de citotoxicidade celular é um ensaio que analisa células metabolicamente ativas. Assim, logo após os cinco dias de tratamento as moscas foram transferidas para eppendorfs com solução Tris-HCl 50 mM pH 7,4, posteriormente centrifugadas e então foi obtido a solução de cada tratamento chamada de S1, para a BBr Livre, BBr EtOH e NPs BBr.

O ensaio baseia-se na capacidade das células vivas de reduzir o anel tetrazólico presente no sal de MTT (Brometo de 3 - (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difenil-tetrazólio)) formando cristais insolúveis de formazan de coloração violeta, de acordo com (LIU et al., 1997) seguindo modificações e otimizando os valores para placa de 96 poços.

É quantificada pela redução do MTT (um sal de coloração amarela e solúvel em água) a formazan (sal de coloração arroxeadada e insolúvel em água) pela atividade daquelas enzimas. Dessa forma, a redução do MTT a formazan, será diretamente proporcional à atividade mitocondrial e a viabilidade celular (Figura 17).

Figura 17: Reação de redução do MTT (um sal de coloração amarela e solúvel em água) a formazan (sal de coloração arroxeadada e insolúvel em água)



Fonte: (MAGALHÃES; THÁ; LEME, 2018)

Assim, em uma placa de 96 poços foi adicionado 180 μ L de solução tampão TFK, 15 μ L da solução do homogeneizado S1 (amostra), e 15 μ L de solução de MTT (0,5mg/ml) solubilizada em Tris-HCl (50 mM, pH 7,4). Em seguida, as placas foram incubadas a 37°C, por uma hora (1h) ao abrigo da luz. Após esse período foi adicionado 40 μ L de dimetilssulfóxido (DMSO) e foi realizado a leitura leitor de placa (Thermo-Plate Reader) no comprimento de onda em 540 nm.

Em uma coluna separada foi feito o branco, no branco foi adicionado 195 uL de solução tampão TFK, 15 uL de MTT e 40 uL de DMSO.

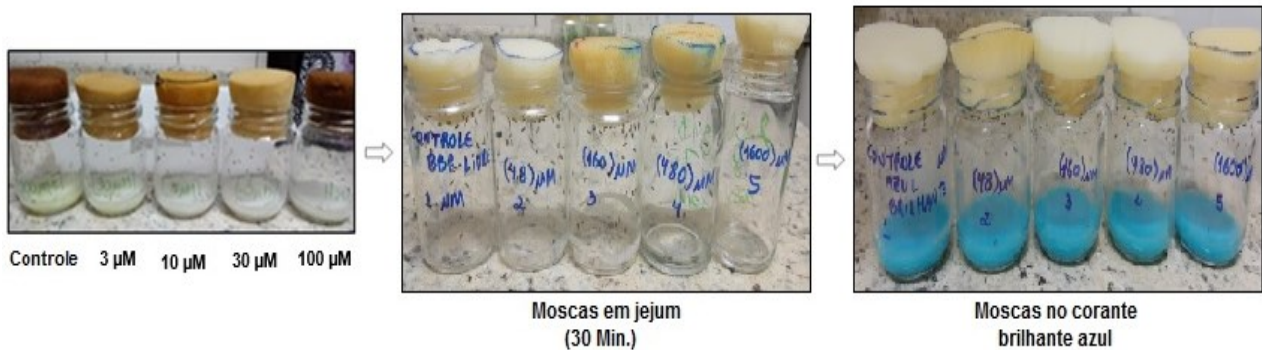
Para o cálculo da viabilidade celular, foi calculado a média das absorbâncias de todos os testes, inclusive do branco e controles. Em seguida, foi subtraído a média absorbância do BRANCO de todos os testes, inclusive do CONTROLE. O valor obtido pela subtração da média dos controles pela média dos brancos foi considerado como 100% de células viáveis. Assim, realizando-se uma regra de três (utilizar o valor obtido pela subtração da média dos testes pela média dos brancos) foi obtido o percentual de células viáveis.

4.4.2.3 Avaliação do efeito do consumo da dieta suplementada com berberina e corante alimentar azul brilhante nas *Drosophila Melanogaster*

Para avaliar os efeitos da dieta suplementada sobre o consumo de alimentos das drosophilas foi utilizado o corante alimentar azul brilhante (*Brilliant Blue FCF*), de acordo com (LUSHCHAK et al., 2011). Para realizar o experimento foi necessário sincronizar os frascos com maior número de larvas e após 2 ou 3 dias, as larvas começaram a eclodirem e mais dois dias as moscas jovens tornaram-se adultas e assim utilizamos para o teste. Em seguida as moscas foram adormecidas sob refrigeração, e foram transferidas 100 moscas (ambos os sexos) para o meio de análise, usando concentrações diferentes (3; 10; 30; 100 μ M) de NPs BBr / BBr Livre água / BBr Livre_EtOH e grupo controle das amostras (durante 5 dias). Após esse período as moscas foram transferidas para frascos sem conter meio de análise e permaneceram durante 30 minutos em jejum (Figura 18). Após esse período foram transferidas 15 moscas (ambos os sexos) para o meio de análise contendo o corante alimentar azul brilhante com uma concentração final de 0,5%, durante 2 horas. Em seguida as moscas foram sensibilizadas em refrigerador doméstico (4°C),

homogeneizadas manualmente em 200 μL de Tris-HCl (50 mM, pH 7,4), centrifugadas a 12.000 rpm por 15 minutos, tomada uma alíquota do sobrenadante (S1) de cada grupo e então armazenada em ultrafreezer vertical ($- 80^\circ\text{C}$) até as análises.

Figura 18: Esquema ilustrativo efeito do consumo da dieta suplementada com berberina e corante alimentar azul



Fonte: Autoria própria (2021)

Para a realização da análise, foi usado uma placa de 96 poços, onde foi adicionado 150 μL de TFK (pH 7,5) e 50 μL S1 e em seguida foi realizada a leitura em um leitor de microplaca a 629 nm.

4.4.2.4 Determinação de atividade da acetilcolinesterase (AChE)

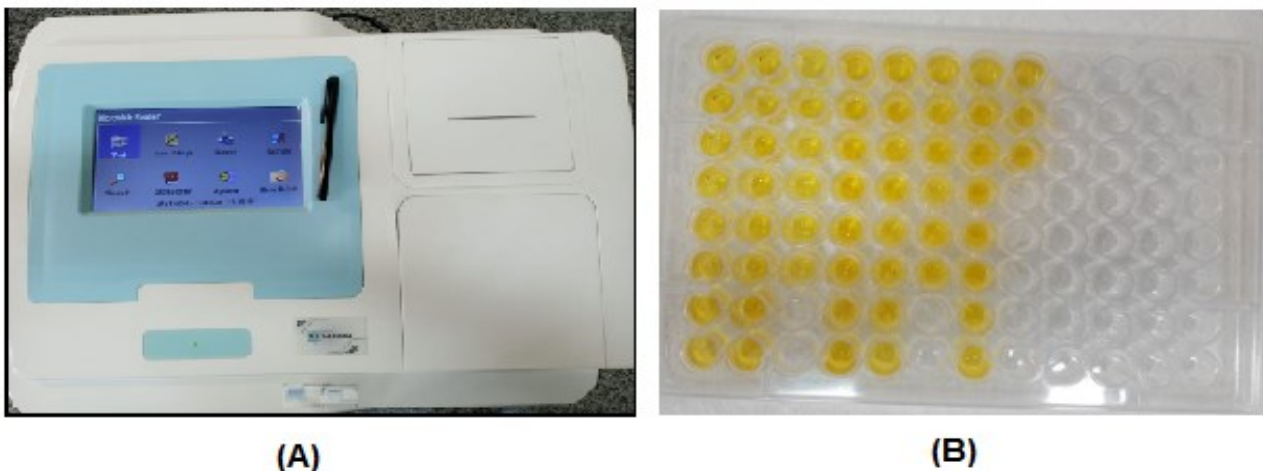
A atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE) foi determinada espectrofotometricamente através do método modificado de (ELLMAN, 1959). Em uma placa de 96 poços foi adicionado 50 μL de solução tampão TFK 50 mM (pH 7,5), 85 μL de água mili-Q, 25 μL da solução do homogeneizado S1 e 20 μL de solução 5,5'-Dithiobis (ácido 2-nitrobenzóico) (DTNB) 2 mM, então foi realizado a leitura do branco em leitor de placa (Thermo-Plate Reader) no comprimento de onda em 405 nm. Em seguida, foi adicionado 20 μL do substrato iodeto de acetiltiocolina (ASCh) 8 mM ao meio reacional e então foram realizadas as leituras a cada minuto durante 4 minutos. A atividade da AChE foi medida através do aumento da absorbância em comprimento de onda de 405 nm e a atividade expressa em % do controle.

4.4.2.5 Determinação de atividade da Butirilcolinesterase (BChE)

A atividade da butirilcolinesterase (BChE) foi determinada segundo o método de (ELLMAN, 1959) com algumas alterações. Ao meio reacional foi adicionado em uma placa de 96 poços 50 μ L de solução tampão TFK 50 mM (pH 7,5), 85 μ L de água mili-Q, 25 μ L da solução do homogeneizado S1 e 20 μ L de solução 5,5'-Dithiobis (ácido 2-nitrobenzóico) (DTNB) 2 mM, então foi realizado a leitura do branco em leitor de placa (Thermo-Plate Reader) no comprimento de onda em 405 nm. Em seguida foi adicionado 20 μ L do substrato iodeto de butiriltocolina (BSCh) 8 mM e realizadas as leituras a cada minuto durante 4 minutos. A atividade da BChE foi medida através do aumento da absorbância em comprimento de onda de 405 nm e a atividade expressa em % do controle. A análise foi realizada em moscas suplementadas com controle, NPs BBr, BBr Livre (e BBr Livre_ EtOH (3; 10; 30; 100 μ M).

Na figura 19 podemos observar o espectrofotômetro (A) e placa de 96 poços (B).

Figura 19: Espectrofotômetro (A) e placa de Elisa (B)



Fonte: Autoria própria (2021)

4.5 Análise estatística

As análises estatísticas foram feitas no software GraphPad Prism versão 6.0, utilizando ANOVA de uma via seguido do teste post hoc de Tukey, a um nível de significância de 5%. Os dados serão expressos em média \pm erro padrão.

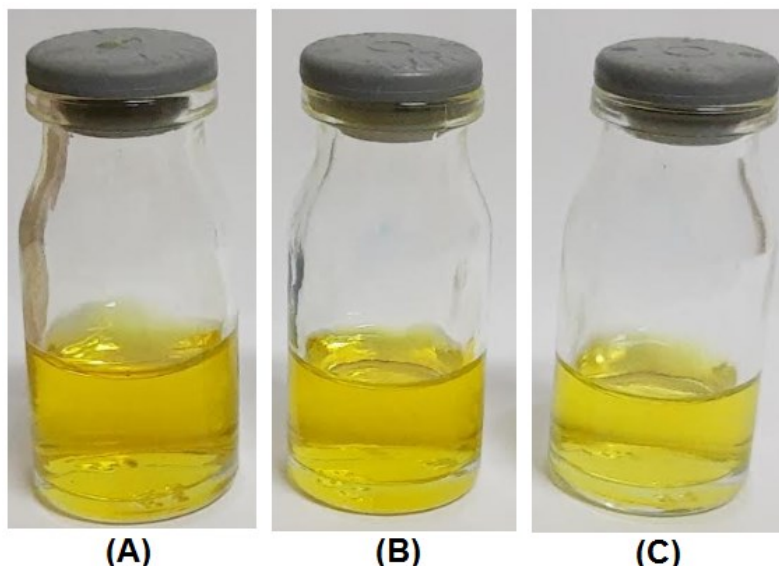
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização das nanopartículas

As nanopartículas de berberina (NPs BBr), mistura física e a berberina livre (BBr) foram devidamente caracterizadas e serão discutidas a seguir.

A Figura 17 representa as imagens das dispersões de BBr Livre água, berberina livre dissolvida em etanol (BBr Livre_EtOH) e as nanopartículas (NPs BBr) de berberina em água em uma concentração de 1600 μM .

Figura 20: Dispersões aquosas de BBr Livre (A), BBr Livre_EtOH (B) e NPs BBr (C)



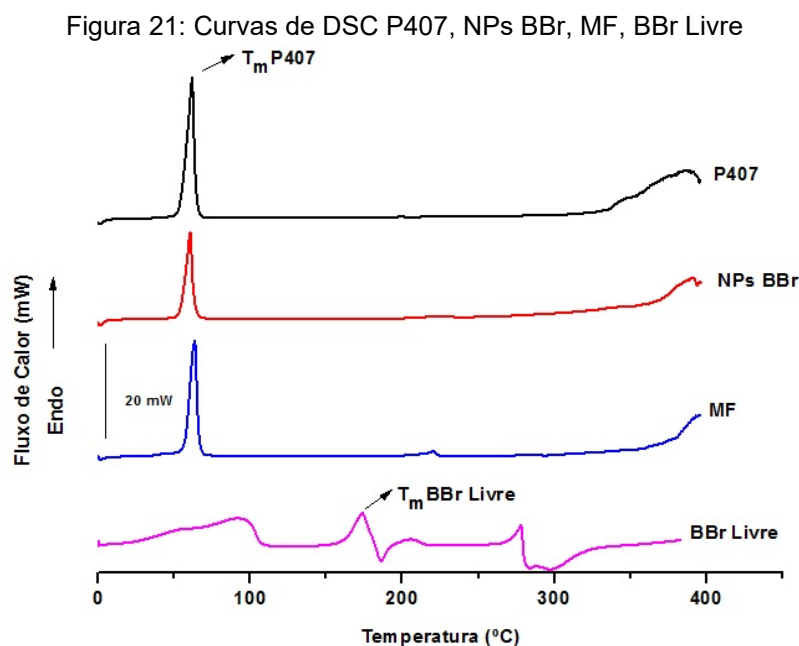
Fonte: Autoria própria (2021)

A análise qualitativa das dispersões aquosas demonstrou que as nanopartículas de berberina puderam ser prontamente dispersas em água, demonstrando um aumento na afinidade da água quando comparada com a alta hidrofobicidade da berberina livre. A BBr Livre_EtOH, também demonstrou dificuldades em sua diluição com etanol, sendo necessário utilizar o agitador magnético, mas nenhuma das diluições apresentaram grumos que pudesse vir a interferir nos resultados das análises. Apesar de todos os benefícios, a berberina apresenta baixa solubilidade em água, resultando em baixa dissolução e biodisponibilidade (LIU et al., 2016; SAHIBZADA et al., 2021).

As análises de DSC permitem elucidar as transições térmicas, as quais estão fortemente associadas à estrutura cristalina (polimorfismo) dos compostos. O evento de

fusão geralmente é evidenciado em compostos cristalinos, sendo que tal evento não aparece em compostos amorfos, salvo algumas exceções. É método que fornece informações sobre temperatura de transição vítrea, ponto de fusão e sobre as variações de energia associadas às transições de fase, incluindo fusão e recristalização, que podem ser usadas para determinar o grau de cristalinidade da amostra (GURUNATH et al., 2013; VO; PARK; LEE, 2013). A ausência do pico de fusão do bioativo na curva DSC indica que a berberina está na forma amorfa (VO; PARK; LEE, 2013).

A Figura 21 apresenta os termogramas de Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC) para Poloxamer 407 (P407), nanopartículas de BBr (NPs BBr), Mistura Física (MF) e berberina Livre (BBr Livre), incluindo a mistura física produzidas na mesma proporção de encapsulante e berberina encontrada nas nanopartículas.



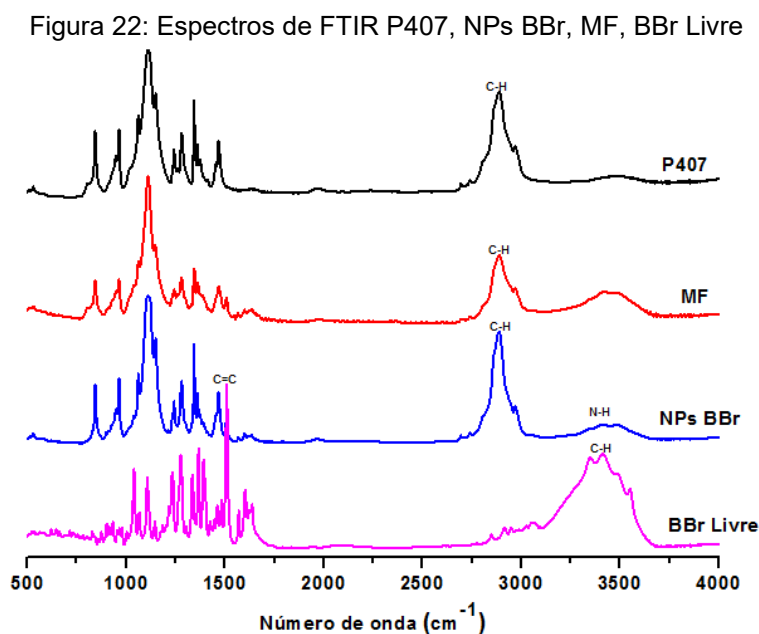
Fonte: Autoria própria (2021)

Nas análises de DSC para BBr Livre observamos vários eventos térmicos, onde estão agregados a região de transição vítrea (T_g), região de cristalização fria e processo de fusão (T_m), com um grau de cristalinidade (X_c %) de 74,6. O ponto de fusão (T_m) da BBr Livre gerou um pico endotérmico acentuado observado a cerca de 186,4 °C próximos a valores encontrados na literatura por outros autores 191,05 °C, 190 °C (VUDDANDA et al., 2014; ZHANG et al., 2013). Um outro ponto a ser observado é o desaparecimento do pico

endotérmico característico da berberina nas nanopartículas, sugerindo a sua conversão do estado físico cristalino para o amorfo após a sua encapsulação esse fenômeno pode indicar uma maior estabilidade térmica proporcionada a berberina pela nano estruturação. O P407 obteve um pico endotérmico logo no início 61,7°C atingindo um grau de cristalinidade (X_c %) de 124,8% e uma T_g 55°C. Os termogramas de DSC mostraram picos endotérmicos em torno de 59 °C, os quais estão relacionados à fusão do P407 (EI-BADRY, 2013; SILVA DE SÁ et al., 2019). Os picos de fusão do MF e NPs foram encontrados em cerca de 60,5°C e 62,9°C, respectivamente.

As análises de espectroscopia é uma técnica que permite estudar as ocorrências de transições vibracionais e rotacionais nas moléculas e a compatibilidade entre fármacos e carreadores decorrentes da exposição da amostra à radiação eletromagnética na região do infravermelho IV (principalmente o IV médio, na região de 400 - 4000 cm^{-1}), (TAYLOR; BUNACIU; ABOUL-ENEIN, 2010; VO; PARK; LEE, 2013). Pode ser representado pelo espectrograma ou em forma de um gráfico de fluxo em função do comprimento de onda.

A Figura 22 apresenta os espectros de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) para Poloxamer 407 (P407), nanopartículas BBr (NPs BBr), Mistura Física (MF) e berberina Livre (BBr Livre), incluindo a mistura física produzidas na mesma proporção de encapsulante e berberina encontrada nas nanopartículas.



Fonte: Autoria própria (2021)

De acordo com a literatura, o espectro de infravermelho da berberina é bastante complexo, apresentando misturas de bandas alongadas de CH e C-C aromática (SNEŽZANA MILJANIĆ, LEO FRKANEC, TOMISLAV BILJAN, 2007).

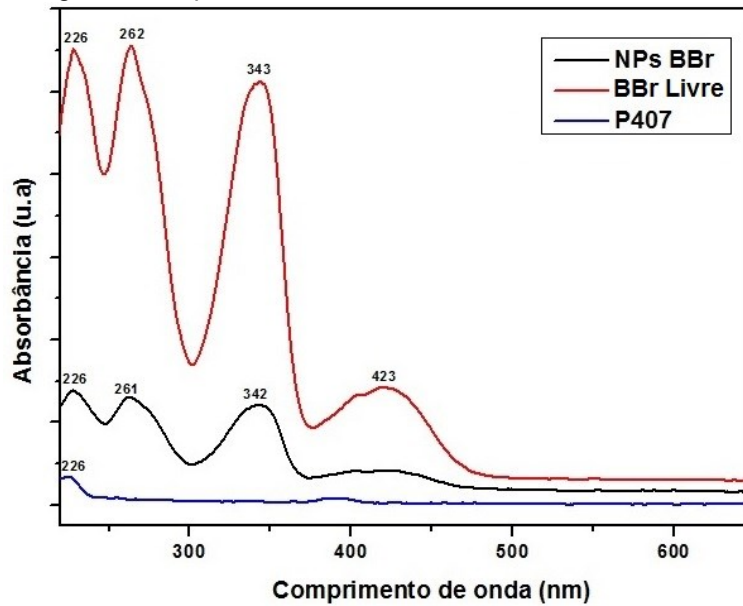
O espectro da BBr Livre exibiu bandas características em torno de 3095-3600 cm^{-1} , referentes ao estiramento =C-H sp^2 , ainda vibrações em 2900 cm^{-1} referentes ao grupo metila CH_3 , as quais apresentam intensidade fraca. Também se evidencia absorções de estiramento de anel, referentes anéis aromáticos C=C, as quais ocorrem em 1506 cm^{-1} (banda intensa e fina) e 1600 cm^{-1} (SOLANKI; PATEL; PATEL, 2021; VUDDANDA et al., 2014). Além disso, foi observado o estiramento C=N (1430-1600 cm^{-1}), que confirmam forma -C=N- do anel heterocíclico (ABBEHAUSEN et al., 2011).

No espectro P407 exibiu um pico principal observado em aproximadamente 1110 cm^{-1} característico de éter aromático C-O. As demais, foi observado nos espectros do P407, MF, NPs BBr bandas em 2289 cm^{-1} , 2889 cm^{-1} e 2883 cm^{-1} , referentes a C-H.

Na figura 22, pode-se verificar por meio da sobreposição dos espectros a incorporação da BBr livre no poloxamer, devido a presença de outros grupos funcionais na nanopartícula de berberina como N-H.

A caracterização por espectroscopia eletrônica de UV-Vis BBr Livre, P407 e NPs BBr foram avaliados na região do UV-VIS de 190 a 1000 nm (Figura 23). É uma análise que o espectro de absorção fornece informações referentes ao espalhamento de luz provocado pelas nanopartículas presentes nas amostras e, por consequência, quanto maior o tamanho das partículas em solução maior a dispersão de luz. Sendo assim, caso ocorra agregação das partículas em solução em função do tempo, serão observadas alterações (aumento de absorbância) no espectro de absorção óptico das suspensões.

Figura 23: Espectros UV-visíveis BBr Livre, P407 e NPs BBr

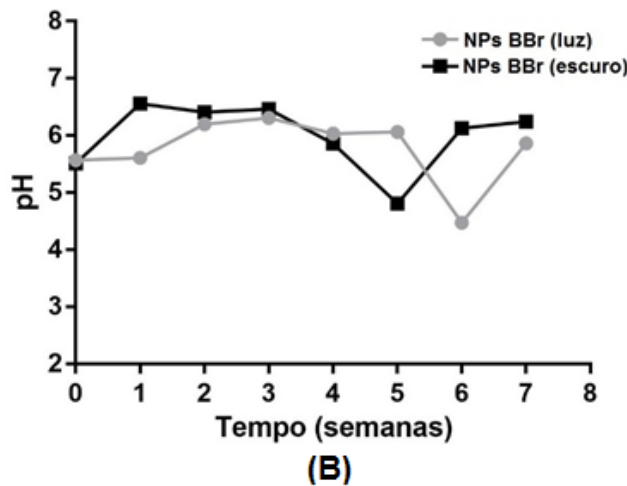
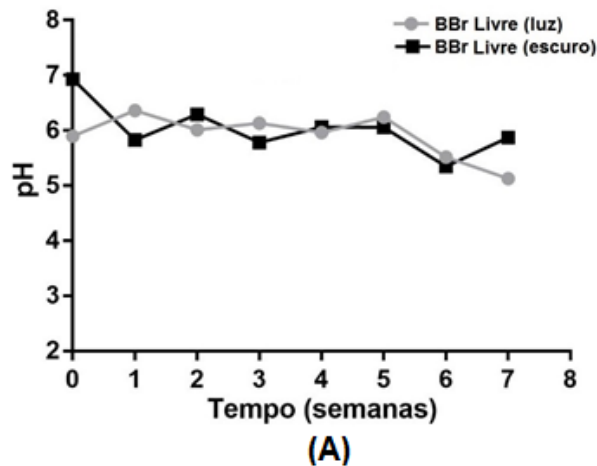


Fonte: Autoria própria (2021)

Na Figura 23 estão apresentadas as sobreposições dos espectros eletrônicos da BBr Livre, NPs BBr e do P407. Sendo possível destacar três bandas intensas com máximos de absorção em 226 nm, 262 nm e 343 nm para berberina. Para as NPs BBr as bandas com maior intensidade de absorção em 227 nm, 261 nm e 343 nm; para o P407 teve uma banda em 226 nm e outra banda na região 389 nm. Segundo estudos realizados foram encontrados espectros de absorção UV-vis de berberina revelando regiões de bandas semelhantes em torno de 250 e 350 nm, que são caracterizados como transição $\pi \rightarrow \pi^*$ (DÍAZ; FREILE; GUTIÉRREZ, 2009; LIN et al., 2017).

Informações relevantes sobre a estabilidade de suspensões de nanopartículas podem ser obtidas monitorando as mudanças no pH ao longo do tempo. Por exemplo, mudanças no pH podem indicar degradação do polímero (MELO, 2010; SCHAFFAZICK et al., 2003). Sendo assim, a fim de observar a estabilidade química do polímero presente nas NPs BBr em função do tempo, foram realizadas medidas de pH durante 60 dias. Foram preparadas duas soluções de NPs BBr na concentração de $37 \mu\text{g.mL}^{-1}$, uma foi armazenada em frasco âmbar (escuro) e outra foi exposta sob luz à temperatura ambiente. De forma similar foi realizado para a BBr Livre para verificar o comportamento do bioativo livre, nas concentrações de $37 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Na Figura 24 – A e B estão representados os gráficos das medidas.

Figura 24: Medidas de pH na BBr Livre (luz) e BBr (escuro) (A) e NPs BBr (luz) e NPs BBr (escuro) (B)



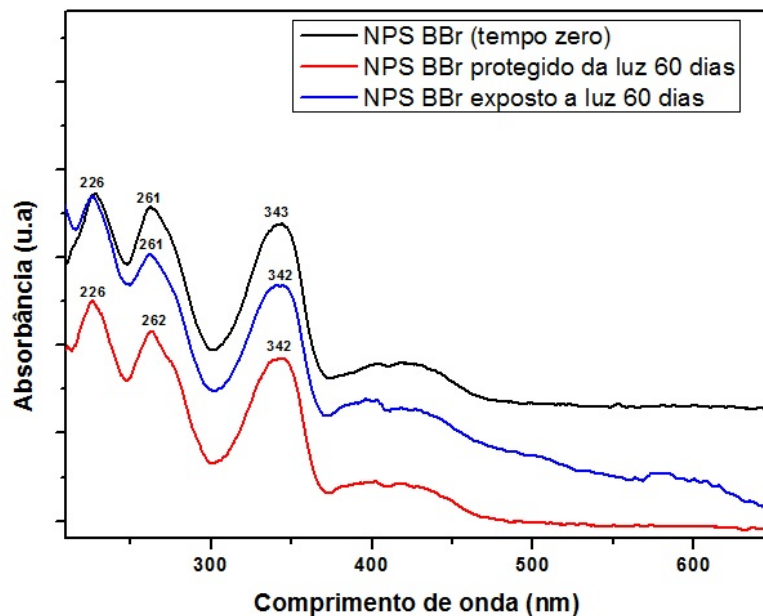
Fonte: Autoria própria (2021)

A partir da Figura 24, pode-se observar que o valor de pH inicial da formulação de BBr Livre (luz) foi de 5,89 e para BBr Livre (protegida de luz, no escuro) foi de 6,93. Nas amostras NPs BBr (luz) e NPs (escuro) foram de 5,56 e 5,51. Além disso, observou-se que a solução preparada para BBr Livre (luz) e BBr Livre (escuro) permaneceu estável em função do tempo 60 dias, não tendo aumento. Já observando os pH das NPs BBr (luz) e NPs (escuro) observou-se um aumento no pH das soluções em função do tempo, sendo de 5,56 e 5,51, ($t=0$), para 6,10 e 6,24 ($t=8$ semanas). O aumento do valor de pH medido para NPs BBr (luz) e NPs (escuro) após estocagem a temperatura ambiente sugere se que pode ter ocorrido devido agregação do polímero com concomitante liberação da fase oleosa no

meio (MELO, 2010). Contudo, não foi observado mudança de cor das soluções e nem a formação de precipitado, mantendo estabilidade em todos os ensaios.

Além de monitorar a estabilidade química do polímero, (através da medida de valores de pH) também foi estudada a estabilidade coloidal da suspensão de nanopartículas, por meio de espectroscopia de formulação baseada no tempo (Figura 25).

Figura 25: Espectro de absorção para formulações de NPs BBr (tempo zero), NPs BBr protegido da luz 60 dias e NPs BBr exposto a luz 60 dias



Fonte: Autoria própria (2021)

A Figura 25 apresenta a sobreposição dos espectros de absorção da NPs BBr protegidas de luz e expostas a luz no $t=0$ (tempo zero) e no $t=60$ dias ou 8 semanas). Assim, comparando-se os espectros de absorções da NPs BBr protegido da luz ($t=60$ dias) e NPs BBr exposto a luz ($t=60$ dias) e observa-se que ambos têm características similares, não ocorrendo degradação ou reações fotoquímicas quando a solução é exposta a luz. Ficou evidente que a primeira leitura realizada ($t=0$) manteve-se originalmente sem alterações. Indicando as nanopartículas em solução apresentam boa estabilidade química.

Estudos da literatura tem mostrado que a espectroscopia pode ser usada para medir a cinética de agregação de partículas em solução e a mudança de sua absorção com o tamanho. Vários fatores podem influenciar na estabilidade das suspensões coloidais como, por exemplo, a adsorção de moléculas ativas à superfície das nanopartículas e a presença de surfactantes adsorvidos. Além disto, é importante avaliar a estabilidade

química dos polímeros formadores de coloide, sob diferentes condições de armazenamento (MELO, 2010; SCHAFFAZICK et al., 2003).

5.1.1 Espalhamento de luz dinâmico (DLS) e potencial zeta das nanopartículas de Berberina (NPs Berberina)

O espalhamento de luz dinâmico (DLS) é usado para caracterizar a dispersão de nanopartículas resultante. O movimento browniano das partículas suspensas faz com que a luz do laser se espalhe em diferentes intensidades e a análise dessas flutuações de intensidade resulta na velocidade do movimento browniano e no tamanho das partículas usando a relação de Stokes-Einstein (LACERDA et al., 2016; XU, 2008). Portanto, é uma das técnicas mais utilizadas oferece informações sobre a distribuição das populações de tamanho das partículas analisadas por meio da determinação do índice de polidispersividade (Pdl). Pdl refere-se à mudança no tamanho da amostra em relação à sua distribuição de intensidade. O valor varia de 0 a 1, e quanto menor o valor, mais monodisperso, portanto, a heterogeneidade da amostra é menor. Além disso, no mesmo instrumento, a carga superficial das partículas pode ser determinada medindo o potencial zeta da superfície, esse valor se refere à carga da dupla camada elétrica que recobre as partículas (LACERDA et al., 2016) (Tabela 1).

Tabela 1: Dados obtidos por DLS referentes ao valor, média, Pdl e potencial zeta da nanopartículas de Berberina (NPs Berberina). Os valores estão representados como média das medidas realizadas em triplicata

Amostra	Tamanho Médio (d.nm)	Pdl	Potencial Zeta (mV)
NPs de berberina sem filtração 1:25	218,5 ± 7,8	0,465 ± 0,09	-3,15 ± 1,0
NPs de berberina filtrada 1:25	307,4 ± 23,1	0,419 ± 0,03	-5,34 ± 1,5

Fonte: Autoria própria (2021)

O valor da média é uma medida que leva em consideração as distribuições de volume e intensidade a qual teve valor de 218,5 d.nm para NPs de berberina sem filtração, com um desvio padrão de $\pm 7,8$ e 307,4 d.nm para NPs de berberina filtrada, com um desvio padrão de $\pm 23,1$. O índice de polidispersividade (Pdl) obtido para a NPs berberina sem filtração foi de 0,465 e de 0,419 NPs berberina filtrada. A importância da obtenção de NPs monodispersos é atribuída à uniformidade das propriedades físico-químicas das NPs no sistema de dispersão coloidal, o que torna as propriedades das NPs obtidos do sistema diretamente relacionadas às propriedades de NPs individuais. Portanto, quanto maior a monodispersidade, maior a uniformidade das propriedades da amostra resultante (SCIENCE; SCIENCE, 1987).

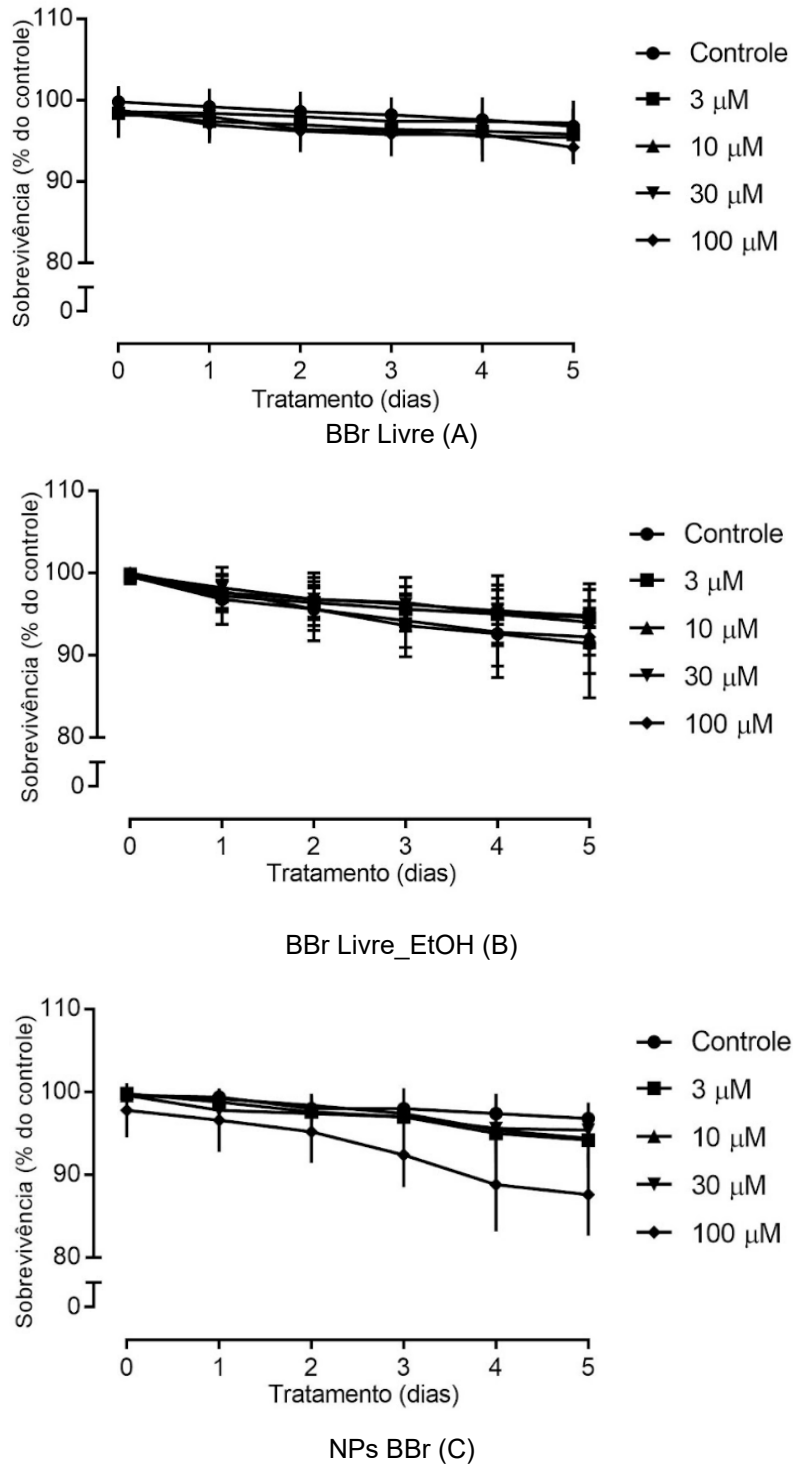
Segundo (LACERDA et al., 2016) potencial zeta é o potencial no plano de cisalhamento hidrodinâmico, que depende da superfície da partícula e do dispersante. No módulo, um valor de potencial zeta relativamente alto é importante para uma boa estabilidade físico-química da suspensão, porque uma grande força repulsiva tende a evitar a agregação causada pela colisão ocasional de nanopartículas adjacentes. Na Tabela 1 acima podemos observar ainda o valor do potencial zeta de superfície das NPs de berberina sem filtração que foi de -3,15 mV, o que demonstra que a superfície dessas partículas está negativamente carregada em meio aquoso. Esse valor não foi próximo ao do valor de potencial zeta de superfície observado para NPs de berberina filtrada, de -5,34 mV.

5.2 Ensaio *in vivo* em *Drosophila melanogaster*

5.2.1 Taxa de sobrevivência/mortalidade

Nesta análise foi determinado o efeito da dieta suplementada com nanopartículas contendo BBr (NPs BBr), BBr Livre em água (BBr Livre) e BBr Livre em etanol (BBr Livre_EtOH) na taxa de sobrevivência das *Drosophilas Melanogaster*. O controle utilizado para NPS BBr e BBr livre foi água, BBr Livre em etanol foi usado etanol. Os resultados estão representados na Figura 26.

Figura 26: Efeito da dieta suplementada com BBr Livre (A), BBr Livre_EtOH (B) e NPs BBr (C) na taxa de sobrevivência em *D. melanogaster*. Os dados foram coletados a cada 24 horas para cada grupo durante 5 dias. Os dados são apresentados como a média \pm erro padrão



Fonte: Autoria própria (2021)

Ao analisar os resultados dos ensaios in vivo, vale ressaltar que tanto a BBr H₂O, BBr Livre_EtOH e NPs BBr são dispersas em meio aquoso e, a seguir, dispersas em aditivos alimentares das *Drosophila melanogaster* que por sua vez é altamente hidrofílico. As *Drosophila melanogaster* mantidas em meio contendo BBr Livre e BBr Livre_EtOH em todas as doses testadas (Fig. 26 A e B) não apresentaram alterações significativas na taxa de sobrevivência quando comparadas ao controle. No caso das NPs BBr (Fig. 26 C), também foi verificado que nas concentrações 3 µM, 10 µM e 30 µM não apresentaram mortalidade significativa, contudo na concentração de 100 µM observou-se maior mortalidade em relação ao controle, como pode ser notado no gráfico. Isso, pode ser justificado devido a elevada dosagem utilizada de NPs BBr. Na literatura é possível encontrar trabalho semelhante, mas analisando a influência da curcumina na taxa de sobrevivência das drosófilas (ABOLAJI et al., 2020).

Na literatura foi constatado que durante um estudo realizado com suplementação usando berberina e moscas do tipo selvagem Oregon de *Drosophila melanogaster* tempo de vida das moscas foi aumentado, prolongando a expectativa de vida em 46% em comparação com as moscas controle sem tratamento com berberina, ou seja, com berberina houve maior expectativa de vida das moscas (NAVROTSKAYA et al., 2014). Outro estudo realizado usando como modelo biológico camundongos, foi relatado que 50% dos animais que não foram tratados com berberina morreram no final do oitavo dia (período teste) após a infecção com *Salmonella typhimurium*. Em contrapartida, depois do tratamento com 10, 20, 30 e 40 mg/kg de berberina, 60%, 60%, 70% e 90%, dos infectados sobreviveram até o 8º dia, respectivamente. Com isso os camundongos infectados sem tratamento com berberina perderam 2,58 % de seu peso corporal, enquanto aqueles no grupo de tratamento com berberina mantiveram ou aumentaram seu peso (CHU et al., 2014). No presente estudo, a suplementação de berberina na dieta das *Drosophila melanogaster* mostrou que embora o processo de encapsulação da berberina tenha aumentado a solubilidade em água, não alterou sua atividade biológica.

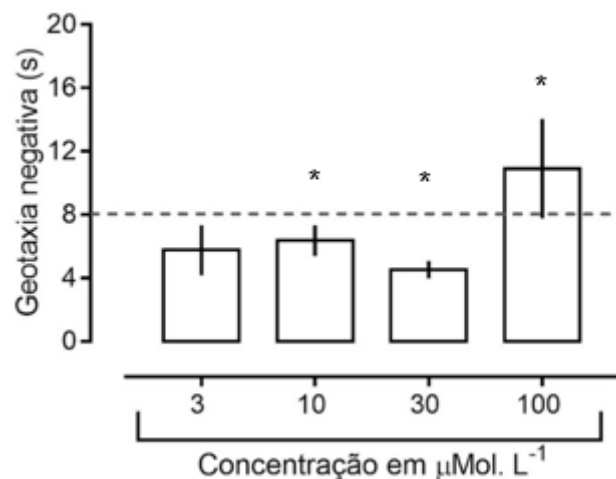
5.2.2 Desempenho locomotor em *Drosophila melanogaster*

A atividade locomotora em *Drosophila melanogaster*, como em outros organismos é um comportamento complexo que pode ser influenciado por diferentes sistemas neurais,

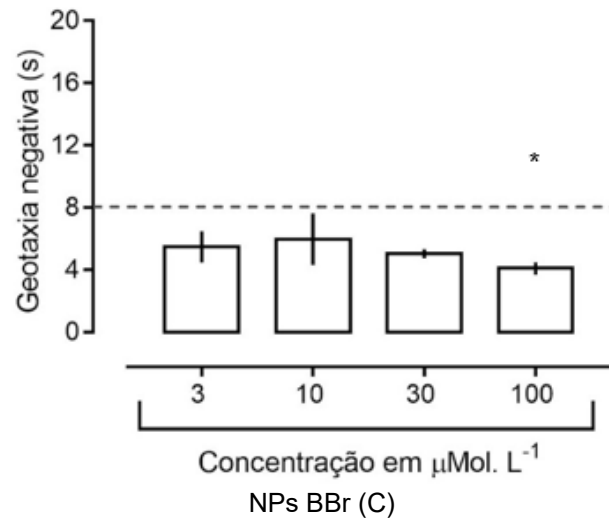
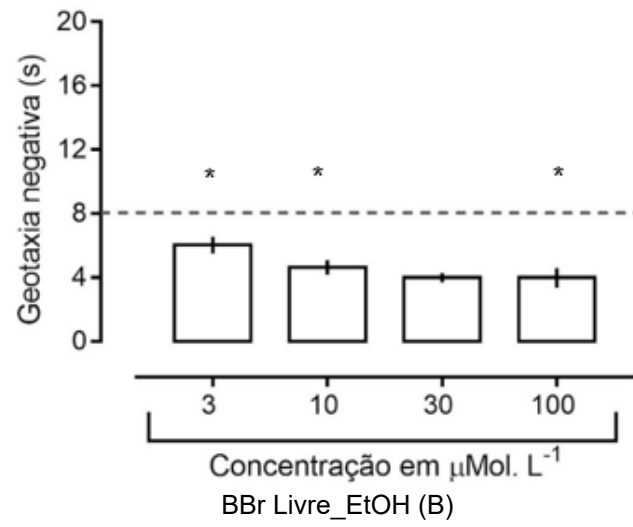
uma vez que está implicado direta ou indiretamente em quase todas as atividades comportamentais. Na verdade, qualquer comportamento realizado pelo animal, como ritmo circadiano, comportamento de busca e até mesmo processos de aprendizagem envolve uma mudança na posição do animal dentro de seu habitat (MARTIN, 2004). Sendo assim, as drosophilas fornece um sistema para explorar os mecanismos que regulam a neurotransmissão aminérgica e como as mudanças na liberação de monoaminas pré-sináptica pode influenciar o comportamento (CHANG et al., 2006).

O teste de geotaxia negativa e base-topo foram usados para analisar a influência na capacidade locomotora em *Drosophila Melanogaster* suplementadas, nanopartículas contendo BBr (NPs BBr), BBr Livre em água (BBr Livre) e BBr Livre em etanol (BBr Livre_EtOH) (Figura 27 e 28).

Figura 27: Efeito da dieta suplementada com controle, BBr Livre em água (BBr Livre) (A), BBr Livre em etanol (BBr Livre_EtOH) (B) e nanopartículas contendo BBr (NPs BBr) (C), na função locomotora em *Drosophila Melanogaster*. Taxa de escalada (expressa como o tempo gasto em segundos para escalar 8 cm). A linha tracejada representa os valores do controle. Os dados são apresentados como a média \pm erro padrão. Cada ensaio foi realizado em cinco experiências independentes (* $p < 0,05$ em relação ao controle). Os grupos de controle receberam dieta com suplemento padrão contendo água ou etanol



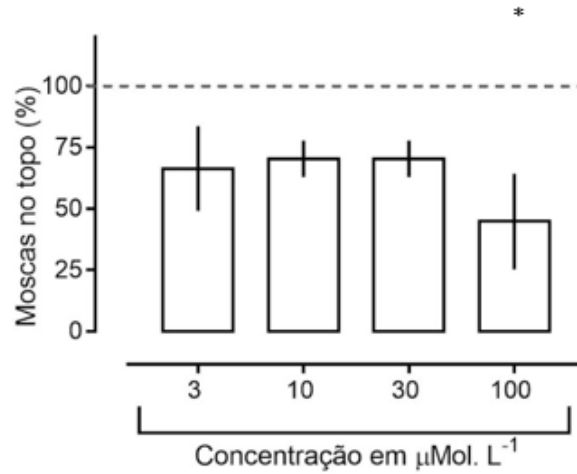
BBr Livre (A)



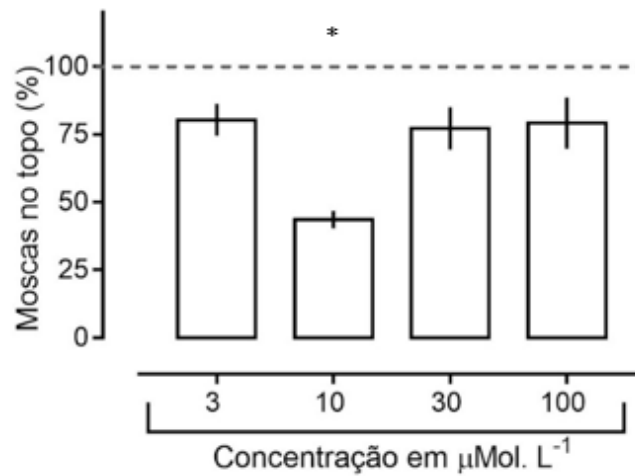
Fonte: Autoria própria (2021)

Figura 28: Efeito da dieta suplementada com controle, BBr Livre em água (BBr Livre), BBr Livre em etanol (BBr Livre_EtOH) e nanopartículas contendo BBr (NPs BBr), na função locomotora em *Drosophila Melanogaster*. Número de moscas no topo (expresso como porcentagem de escalada de 6 cm em 5 s) por ensaio de base topo em moscas suplementadas com BBr Livre (D), BBr Livre_EtOH (E) e NPs BBr (F). A linha tracejada representa os valores do controle. Os dados são apresentados como a média \pm erro padrão.

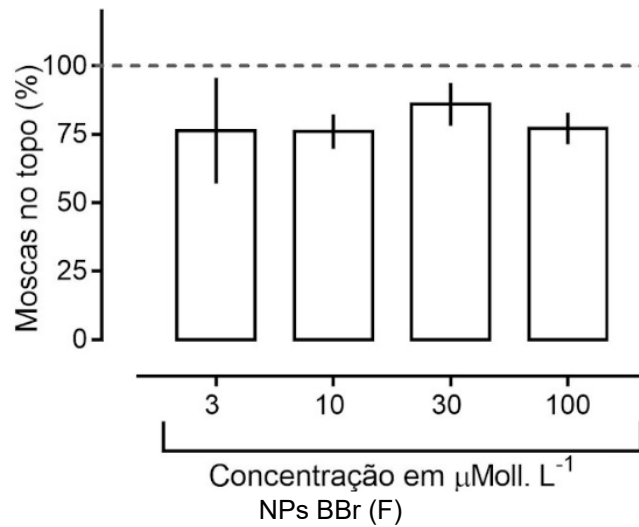
Cada ensaio foi realizado em cinco experiências independentes (* $p < 0,05$ em relação ao controle). Os grupos de controle receberam dieta com suplemento padrão contendo água ou etanol



BBr Livre (D)



BBr Livre_EtOH (E)



Fonte: Autoria própria (2021)

A locomoção espontânea das moscas é uma avaliação do comportamento da sua caminhada, portanto, uma medida de atividade não vigorosa é fornecida, que pode ser interpretada como um nível de atividade basal. A escalada vertical é uma avaliação da capacidade do animal em realizar uma atividade totalmente extenuante, porque as moscas devem superar a gravidade para escalar o topo do frasco, o que nos dá uma visão sobre o nível de aptidão física do animal (LEE et al., 2010). Os fenótipos comportamentais das drosophilas, como o ritmo circadiano e as atividades de sono e repouso, são muito sensíveis às diferenças genóticas na idade dos animais. Portanto, é importante avaliar esses fenótipos usando animais de controle adequados criados nas mesmas condições ambientais (CHIU et al., 2010; WILLIAMS et al., 2007).

O desempenho na escalada foi avaliado pelo teste de geotaxia negativa e base-topo. As moscas suplementadas com BBr Livre, BBr Livre_EtOH, NPs BBr exibiram um déficit motor significativo dependente da dose. O desempenho locomotor diminuiu significativamente nas doses de 10 e 30 μM ($*p < 0,05$) em comparação com o grupo controle para BBr Livre, e em 100 μM apresentou um aumento significativo ($*p < 0,05$ quando comparado ao controle) na velocidade das moscas em realizar a subida, apresentando uma diminuição do tempo médio gasto por estas, para atingir a altura desejada (Fig. 27 A). Nas amostras de BBr Livre_EtOH o desempenho locomotor diminuiu significativamente na dose 3 μM , 10 μM e 100 μM ($*p < 0,05$) em comparação com o grupo controle, (Fig. 27 B). Já nas

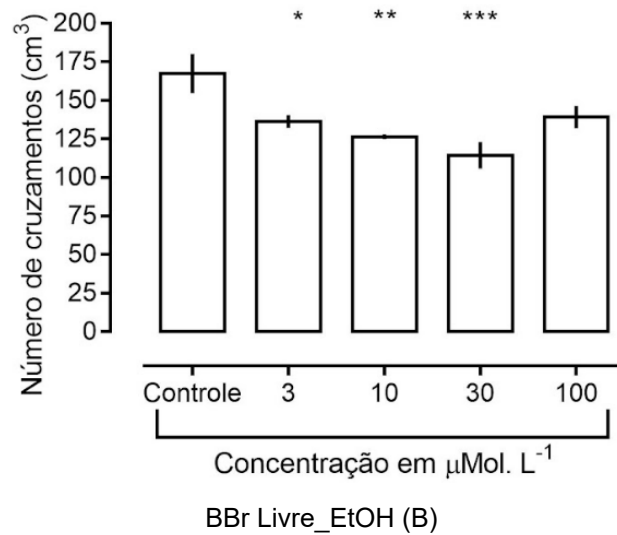
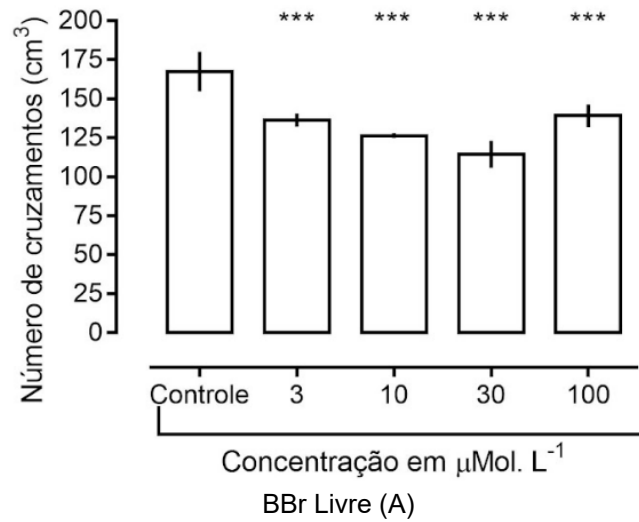
amostras suplementadas com NPs BBr pode-se notar que nas doses 3, 10 e 30 μM o desempenho locomotor das DM diminuíram, e apresentou um aumento não significativo em 100 μM quando comparados ao grupo controle (Fig. 27 C). Estudos realizados com doses altas de ferro em *Drosophila* demonstraram efeitos semelhantes ao Parkinson diminuindo a sobrevivência e atividade locomotora (BONILLA-RAMIREZ; JIMENEZ-DEL-RIO; VELEZ-PARDO, 2011; JIMENEZ-DEL-RIO; GUZMAN-MARTINEZ; VELEZ-PARDO, 2010) Moscas expostas ao ferro apresentaram aumento na mortalidade, e os sobreviventes tiveram déficits locomotores significativos com aumento da atividade da AChE. O tratamento com hesperidina foi eficaz na redução dos déficits neuromotores, teste de geotaxia negativo (escalada) e no teste de campo aberto (classificação de capacidade exploratória) (POETINI, 2017).

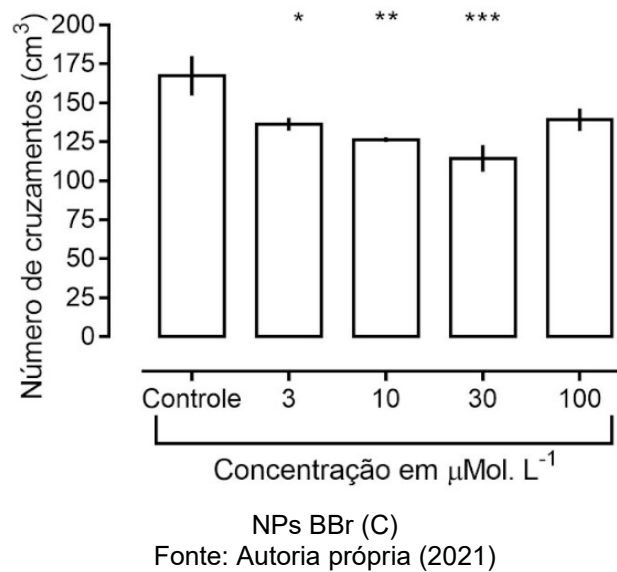
Para o teste de base-topo, observou-se que quando as moscas foram tocadas no fundo do frasco, apenas 70% das moscas pertencentes ao grupo controle alcançaram o topo da coluna em 5s. No entanto, a suplementação com BBr Livre na dose de 100 μM e BBr Livre_EtOH de na dose de 10 μM exibiram um decaimento significativo na capacidade de subida das moscas pertencentes a este grupo em comparação ao controle (Fig. 28 (D) e (E); * $p < 0,05$). Já as moscas suplementadas com NPs BBr não exibiram comprometimento locomotor significativo em relação a seu grupo controle (Fig. 28 (F)). Resultados semelhantes foram apresentados para ensaios em tratamento de *Drosophila Melanogaster* mas utilizando curcumina (0,2 e 1,0 mg/g) (AKINYEMI et al., 2018). Em outro estudo a atividade locomotora da berberina estimulou a escalada vertical das moscas em 39%, e aumentou a expectativa de vida na dose de berberina (1 mM), aumentando a média em 27%, a mediana em 57%) e a expectativa de vida máxima em 78% das moscas (NAVROTSKAYA et al., 2012).

5.2.3 Teste de campo aberto

O teste de campo aberto foi realizado para analisar a influência na função exploratória em *Drosophila Melanogaster* suplementadas com controle, BBr Livre, BBr Livre_EtOH e NPs BBr (Figura 29).

Figura 29: Efeito da dieta suplementada com controle, BBr Livre (A), BBr Livre_EtOH (B) e nanopartículas contendo NPs BBr (C), na função locomotora em *Drosophila Melanogaster*. Valores de cruzamento (expressos como número de cruzamentos de uma área de 1 cm³). A linha tracejada representa os valores do controle. Os dados são apresentados como a média \pm erro padrão. Cada ensaio foi realizado em cinco experiências independentes (* $p < 0,01$ em relação ao controle). Os grupos de controle receberam dieta com suplemento padrão contendo água ou etanol





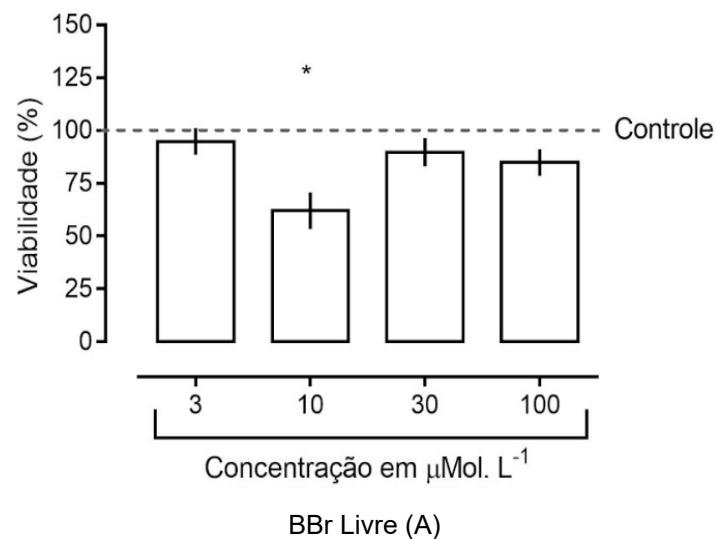
O estudo pelo teste de campo aberto mostra que o grupo exposto à BBr Livre e BBr Livre_EtOH a concentração de 30 μM apresentou menor atividade exploratória quando comparado ao grupo controle (Fig. 29 (A) e Fig. 29 (B)) as outras concentrações em ambos os tratamentos se mostraram significativos a atividade exploratória. Para as NPs BBr a concentração que apresentou menor atividade exploratória foi a de 10 μM em relação ao controle, isso tudo sugere que a matriz polimérica não apresentou influência no comportamento exploratório das moscas em relação a BBr Livre. Segundo (ALMEIDA et al., 2017) a exposição das drosophilas aos compostos hesperidina e hesperitina nas concentrações de 1, 10 ,25 , 50 e 100 μM , não apresentaram diferença estatisticamente significativa quando comparados ao grupo controle, ou seja, não constatou nenhuma alteração na mobilidade das moscas tratadas. Estudos relacionadas ao comportamento e aos danos bioquímicos nas *Drosophila melanogaster* induzidos pela exposição a compostos nocivos e ao tratamento / efeito reverso da suplementação fotoquímica são bastante evidentes, apresentando resultados satisfatórios e interessantes (PARK et al., 2012).

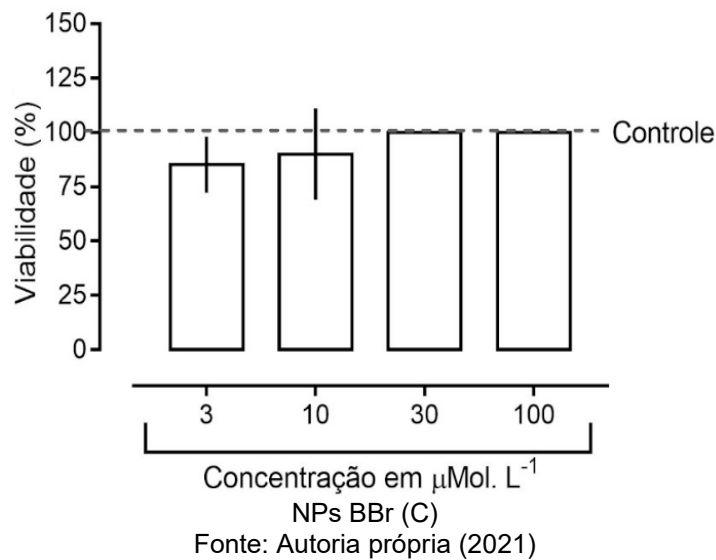
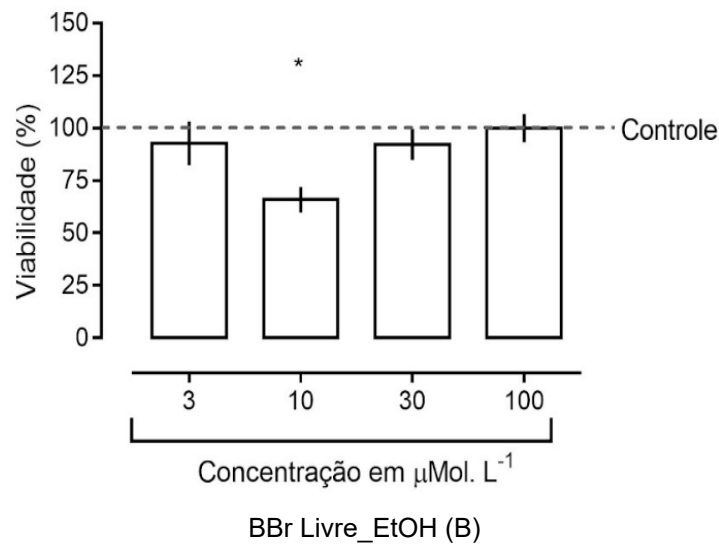
5.3 Ensaio *ex vivo* em *Drosophila melanogaster*

5.3.1 Avaliação de citotoxicidade celular

Após os tratamentos de BBr Livre, BBr Livre_EtOH e NPs BBr foi realizado teste de citotoxicidade *ex vivo* para avaliar a viabilidade das células vivas nas amostras. A viabilidade celular foi determinada pelo método MTT, o qual se baseia na capacidade das células vivas de reduzir o anel de tetrazóico presente no sal de MTT, através da ação de enzimas desidrogenadas presentes na mitocôndria ativa. Os resultados estão representados na Figura 30.

Figura 30: Gráfico da viabilidade celular com controle, BBr Livre (A), BBr Livre_EtOH (B) e NPs BBr, *ex vivo* no tecido de *Drosophila melanogaster*. Resultados expressos em porcentagens de células viáveis





Os resultados da viabilidade celular com amostras de BBr Livre, BBr Livre_EtOH e NPs BBr a maioria foram acima de 90%, o que indica uma baixa citotoxicidade para todas as amostras. Mas ao analisarmos a Figura 30 e dados estatísticos, BBr Livre (A) e BBr Livre_EtOH (B) nota-se um aumento na morte celular significativo na concentração de 10 μM , sugerindo que as amostras possuem maior citotoxicidade resultando em um índice de sobrevivência de apenas 70%. Na concentração de 3 μM de BBr Livre a viabilidade celular foi de 85,2 % (N=5), havendo apenas 14,5 % de morte celular. Ainda na Figura 26 podemos destacar que nas concentrações de 30 μM e 100 μM de NPs BBr (C) obterão 100 % de viabilidade celular, demonstrando que as amostras não apresentaram citotoxicidade.

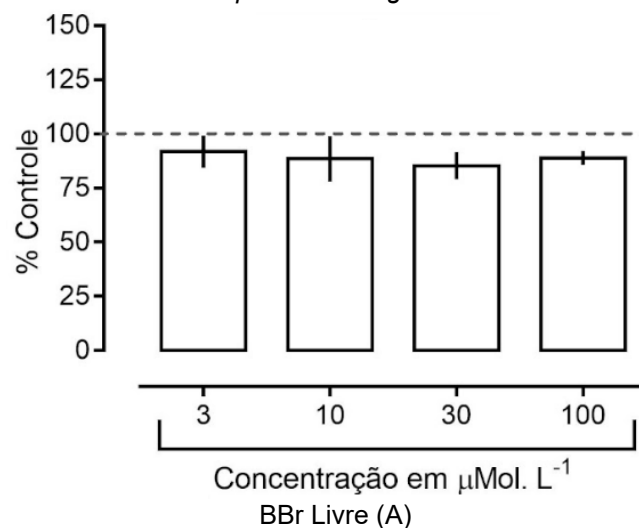
Segundo (DHAWAN et al., 2003), os compostos citotóxicos são chamados de agentes tóxicos além do seu efeito citostático, tem efeitos adversos, como por exemplo, a genotoxicidade. Os efeitos genotóxicos podem ser analisados por vários testes, como ensaio do cometa (TICE et al., 2000).

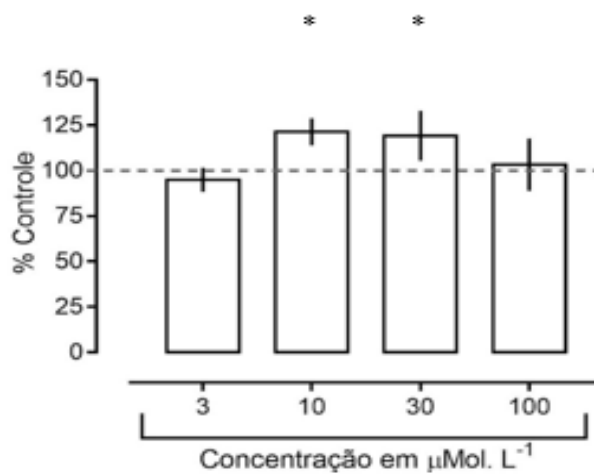
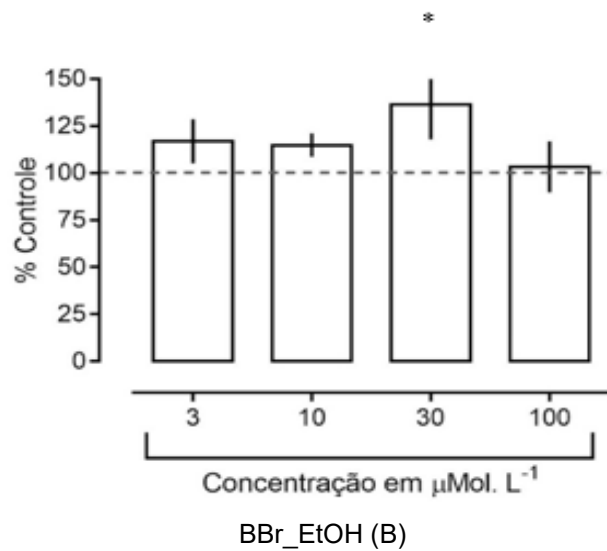
Analisando a Figura 30 de uma forma geral os tratamentos BBr Livre, BBr Livre_EtOH e NPs BBr com diferentes concentrações não apresentaram citotoxicidade aparentemente relevante.

5.3.2 Avaliação do efeito do consumo da dieta suplementada com berberina e corante alimentar azul brilhante nas *Drosophila melanogaster*

Para avaliar os efeitos da dieta suplementada com controle contendo, BBr Livre, BBr Livre_EtOH e NPs BBr em *Drosophila melanogaster* sobre o consumo do meio de análise foi avaliada usando o corante alimentar azul brilhante, usando diferentes concentrações (3; 10; 30; 100 μ M) e podem ser observados na Figura 31.

Figura 31: Avaliação da dieta suplementada com BBr Livre (A), BBr Livre_EtOH (B), NPs BBr (C) e corante azul brilhante em ex vivo no tecido de *Drosophila melanogaster*. Resultados expressos em porcentagens.





NPs BBr (C)

Fonte: Autoria própria (2021)

Na Figura 31, pode-se observar que na BBr Livre (A), o consumo médio foi de 78%, nas diferentes concentrações (3; 10; 30; 100µM) analisadas, não houveram diferenças de consumo. Ou seja, as drosophilas diminuíram o consumo no tratamento utilizado, isso pode ter ocorrido por diversos fatores, entre eles o próprio corante misturado a BBr Livre que pode ter causado algum gosto desagradável, já que a *Drosophila melanogaster* possui comportamento olfativo em relação a fontes alimentares (ANHOLT, 2020). Já na Figura 31 BBr Livre_EtOH (B) e NPs BBr (C) pode-se notar um maior consumo da dieta suplementada, acima de 90%, e ainda destacar destaque-se algumas diferenças entre as concentrações, o tratamento com BBr Livre_EtOH (B) destaca a dose de 30 µM onde

ocorreu maior consumo do meio em análise, e para o tratamento de NPs BBr (C) as doses que mais houveram consumo foram as de 10 μM e 30 μM . Em um trabalho realizado por (LUSHCHAK et al., 2011) com as larvas de *Drosophila melanogaster* e corante azul brilhante, o consumo observado na dieta com 4% de frutose, resultou no maior consumo das larvas, na ordem de 1,5 vezes a mais do que dieta de 10%, enquanto em as mesmas concentrações de glicose, as larvas consumiram 2,3 vezes na concentração mais alta. De uma forma geral, quando analisamos todos os tratamentos e as concentrações diferentes não houve diferença significativa no consumo da dieta suplementada com o corante azul, demonstrando um bom resultado.

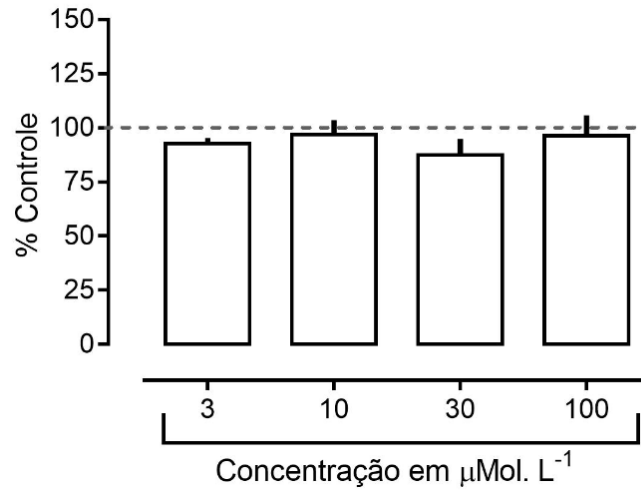
Alguns estudos têm demonstrado que uma variedade de organismos estende a vida útil ao restringir os alimentos. No entanto, a maioria dos estudos é realizada principalmente em roedores, o que deixa uma lacuna significativa em nosso entendimento da resposta de outras espécies. Em particular, a *Drosophila melanogaster* é um organismo controverso em termos de dieta e pesquisa de longevidade, e alguns pesquisadores acreditam que a drosophila é uma exceção a esse efeito. Assim, tem havido relativamente poucas investigações sobre os hábitos alimentares de drosophilas adultos (BROSS; ROGINA; HELFAND, 2005; FOLEY; LUCKINBILL, 2001).

5.3.3 Determinação da atividade das colinesterases AChE e BChE

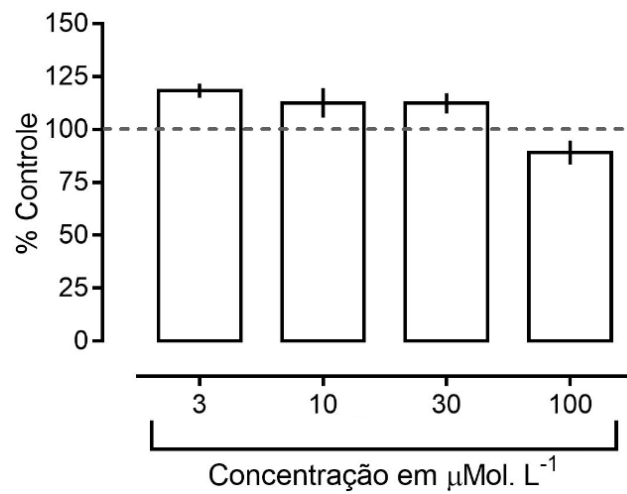
As enzimas acetilcolinesterase (AChE, EC 3.1.1.7) e butirilcolinesterase (BChE, EC 3.1.1.8) são serina-hidrolases amplamente encontradas em várias espécies animais com a finalidade de hidrolisar o neurotransmissor acetilcolina (AQUINO et al., 2013). Entretanto, uma queda acentuada nos níveis desse neurotransmissor resulta na diminuição da função cerebral e, conseqüentemente, na perda progressiva de habilidades intelectuais.

Na Figura 32 obtivemos os resultados da atividade enzimática de AChE e Figura 33 BChE.

Figura 32: Efeito da BBr Livre (A), BBr Livre_EtOH (B) e NPs BBr (C), na atividade da enzima AChE *ex vivo* no tecido de *Drosophila melanogaster*. A linha tracejada representa o valor do grupo controle. Valores expressos em média \pm erro padrão (n = 5 por grupo). Significância determinada pela análise de variância unidirecional (ANOVA) seguida do teste de Tukey. Os grupos de controle receberam dieta com suplemento padrão contendo água ou etanol



BBr Livre (A)



BBr Livre_EtOH (B)

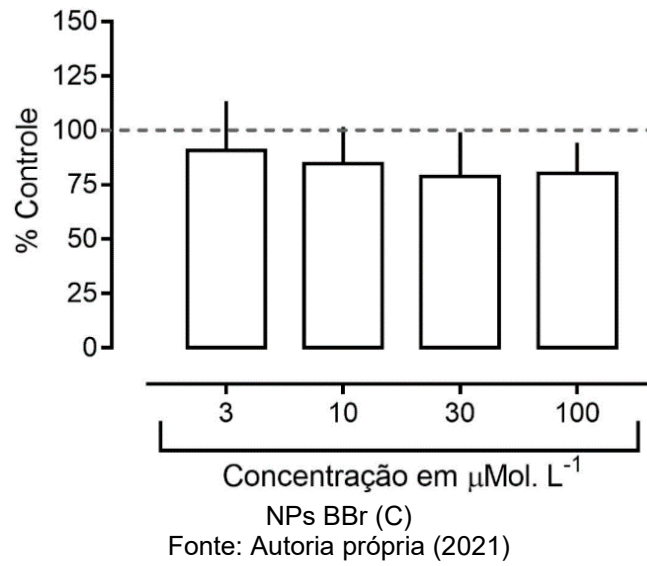
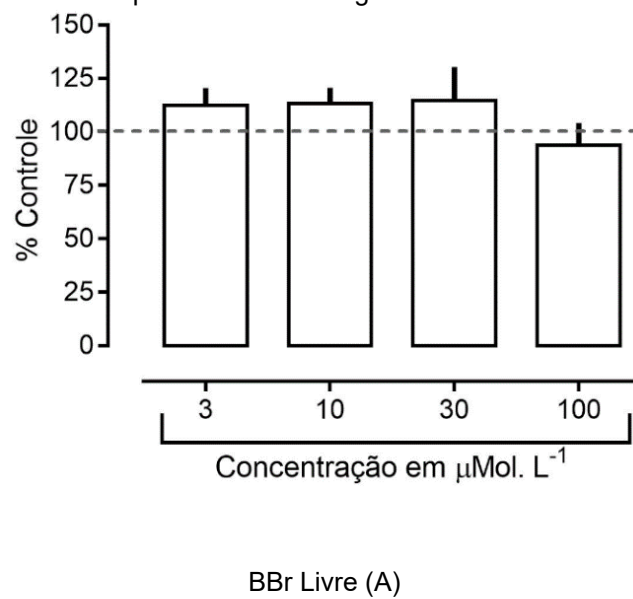
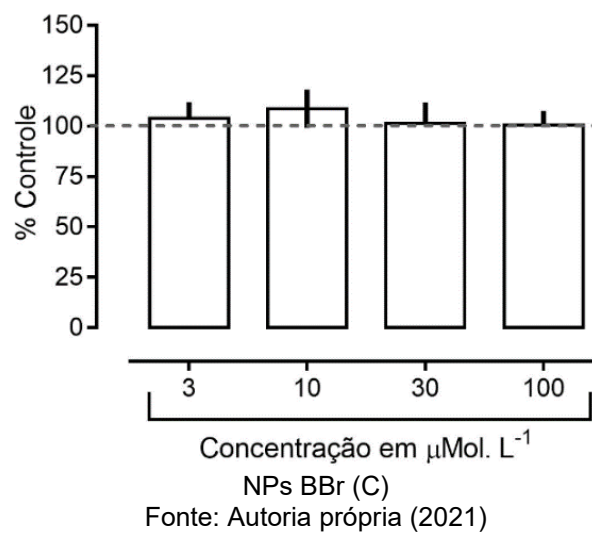
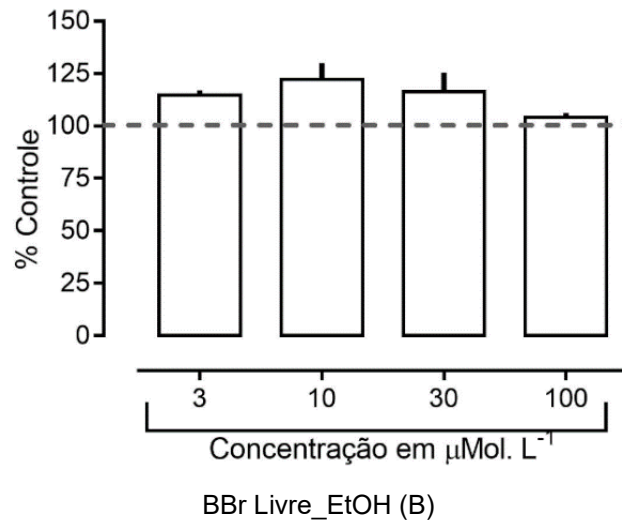


Figura 33: Efeito da BBr Livre (A), BBr Livre_EtOH (B) e NPs BBr (C), na atividade da enzima BChE *ex vivo* no tecido de *Drosophila melanogaster*. A linha tracejada representa o valor do grupo controle. Valores expressos em média \pm erro padrão (n = 5 por grupo). Significância determinada pela análise de variância unidirecional (ANOVA) seguida do teste de Tukey. Os grupos de controle receberam dieta com suplemento padrão contendo água ou etanol





Observando os tratamentos BBr Livre, BBr Livre_EtOH e NPs BBr nos gráficos (Figura 32) nenhuma dose testada se mostrou significativo na atividade da AChE (quando comparado ao grupo controle). A AChE está presente no sistema nervoso central e seu principal papel é catalisar a hidrólise do neurotransmissor acetilcolina (ACh) em colina. Esse processo pode restaurar os neurônios colinérgicos ativados ao seu estado de repouso. Em estudo realizado com ratos diabéticos em relação ao controle a berberina não influenciou na atividade AChE (BHUTADA et al., 2011).

Em outro estudo realizado com a curcumina sobre sua influência na atividade da AChE relatou a diminuição da atividade da AChE em relação ao controle (ABOLAJI et al., 2020). Como um aumento ou uma diminuição da atividade da AChE pode comprometer a atividade locomotora e outros comportamentos. Além disso, alcalóides derivados de

plantas, como berberina, evodiamina, cafeína, isorrincofilina, tetrametilpirazina e trigonelina demonstra propriedades neuroprotetoras em vários modelos experimentais e são frequentemente associados a seus anticolinesterásicos, antioxidantes e anti-inflamatórios (OYETAYO et al., 2020).

Observando os tratamentos BBr Livre, BBr Livre_EtOH e NPs BBr na atividade da BChE (Figura 30) também não apresentou nenhuma inibição (quando comparado ao grupo controle). Estudos demonstram que podem aumentar a concentração e a duração da ACh por meio da inibição da AChE e BChE podem fornecer benefícios terapêuticos e efeitos neuroproteção (LOIZZO et al., 2008; OMAR et al., 2017). Estudos realizados demonstram a inibição da BChE a partir de 30 μ M em experimentos *in vitro* com *Drosophila Melanogaster* com nanopartículas contendo curcumina, mas com encapsulante diferentes (SILVA DE SÁ et al., 2019).

A influência de nanopartículas de berberina nas enzimas AChE e BChE ainda é pouco conhecida em *Drosophila melanogaster*, no entanto, realizamos o estudo com a finalidade de testar a letalidade induzida por exposição das células de *Drosophila melanogaster*, utilizando BBr Livre, BBr Livre_EtOH e NPs BBr como constituinte de efeito neuroprotetor, sendo que não obtivemos resultados expressivos. Estudos mostram que a atividade da enzima colinérgica é reduzida e pode compensar a neurotoxicidade induzida (PARK et al., 2012; PRASAD, 2014).

6 CONCLUSÃO

Os experimentos realizados demonstram que a nanoencapsulação da berberina com o encapsulante poloxamer 407 foram eficientemente produzidas pela técnica de dispersão sólida por evaporação do solvente. Os resultados da caracterização demonstram que partículas nanométricas foram formadas demonstrando que a berberina foi encapsulada na matriz polimérica, passando do estado cristalino para uma solução amorfa sólida, ou seja, foram formadas nanopartículas que são melhor dispersas em água.

A suplementação da dieta de *Drosophila melanogaster* com nanopartículas carregadas com berberina não apresentou letalidade na dose testada e manteve as características da berberina, indicando que as nanopartículas apresentam baixa toxicidade.

Mudança no desempenho locomotor das moscas suplementadas com BBr Livre, BBr Livre_EtOH, NPs BBr exibiram um déficit motor significativo dependente da dose.

Ensaio de viabilidade celular mostraram que o índice de viabilidade celular com amostras de BBr Livre, BBr Livre_EtOH e NPs BBr a maioria foram acima de 90%, indicando baixa citotoxicidade.

Na dieta suplementada utilizando corante alimentar azul brilhante as *Drosophila melanogaster* diminuíram o consumo no tratamento com BBr Livre e nos tratamentos com BBr Livre_EtOH e NPs BBr teve um consumo maior que 90%.

Os resultados encontrados nos testes in vivo e ex vivo mostram que as mudanças de comportamento encontradas não estão relacionadas com as atividades enzimáticas de acetilcolinesterase e butirilcolinesterase.

Os maiores efeitos em sistemas aquosos podem ser justificados pelo encapsulamento eficiente da berberina com o poloxamer 407, que apresenta capacidade surfactante conhecida. Acreditamos que mais estudos usando *Drosophila* e outros modelos in vivo podem ser necessários para estudar a toxicidade das nanopartículas de berberina e os mecanismos envolvidos. Entretanto, podemos concluir que esse trabalho mostrou a baixa toxicidade da berberina, tanto na forma livre quanto na forma encapsulada com P407 e que poderão ser utilizadas em formulações alimentícias com segurança.

REFERÊNCIAS

- ABBEHAUSEN, C. et al. Synthesis, spectroscopic characterization, DFT studies and biological assays of a novel gold(I) complex with 2-mercaptothiazoline. **Polyhedron**, v. 30, n. 13, p. 2354–2359, 2011.
- ABEYKOON, C. et al. Process efficiency in polymer extrusion: Correlation between the energy demand and melt thermal stability. **Applied Energy**, v. 135, p. 560–571, 2014.
- ABOLAJI, A. O. et al. Curcumin attenuates copper-induced oxidative stress and neurotoxicity in *Drosophila melanogaster*. **Toxicology Reports**, v. 7, n. January, p. 261–268, 2020.
- ACIOLE, E. H. P. et al. Genetic toxicity of dillapiol and spinosad larvicides in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. **Pest Management Science**, v. 70, n. 4, p. 559–565, 2014.
- AHMED, T. et al. Berberine and neurodegeneration: A review of literature. **Pharmacological Reports**, v. 67, n. 5, p. 970–979, 2015.
- 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, n. 2, p. 369–375, 2018.
- ALMEIDA, F. P. DE et al. Avaliação comportamental e bioquímica em *drosophila melanogaster* expostas aos flavonoides hesperidina e hesperitina. **SALÃO INTERNACIONAL DE ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO - SIEPE**, p. 6, 2017.
- ALSHAHRANI, S. M. et al. Stability-enhanced Hot-melt Extruded Amorphous Solid Dispersions via Combinations of Soluplus® and HPMCAS-HF. **AAPS PharmSciTech**, v. 16, n. 4, p. 824–834, 2015.
- ALTEMIMI, A. et al. Phytochemicals: Extraction, isolation, and identification of bioactive compounds from plant extracts. **Plants**, v. 6, n. 4, 2017.
- ANDERSEN, M. L.; WINTER, L. M. F. e20170238 (Annals of the Brazilian Academy of Sciences) *An Acad Bras Cienc*. **An Acad Bras Cienc**, v. 91, n. 1, p. 1–14, 2019.
- ANHOLT, R. R. H. Chemosensation and Evolution of *Drosophila* Host Plant Selection. **iScience**, v. 23, n. 1, p. 100799, 2020.
- AQUINO, R. A. N. et al. Synthesis, kinetic studies and molecular modeling of novel tacrine dimers as cholinesterase inhibitors. **Organic and Biomolecular Chemistry**, v. 11, n. 48, p. 8395–8409, 2013.
- 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.

ARAÚJO, R. F. et al. Alterações fisiológicas e atividade de enzimas antioxidantes em sementes de pimentas *Capsicum chinense* Jacq e *Capsicum frutescens* L. durante o processo de maturação. p. 534–545, 2018.

BANNACH, G. et al. Efeitos da história térmica nas propriedades do polímero pet: Um experimento para ensino de análise térmica. **Química Nova**, v. 34, n. 10, p. 1825–1829, 2011.

BEGUM, S. et al. In-vitro evaluation and in-silico studies applied on newly synthesized amide derivatives of N -phthaloylglycine as Butyrylcholinesterase (BChE) inhibitors. **Computational Biology and Chemistry**, v. 74, p. 212–217, 2018.

BELLEN, H. J.; TONG, C.; TSUDA, H. a History Lesson for the Future. **Neuroscience**, v. 11, n. July, p. 514–522, 2010.

BHUTADA, P. et al. Protection of cholinergic and antioxidant system contributes to the effect of berberine ameliorating memory dysfunction in rat model of streptozotocin-induced diabetes. **Behavioural Brain Research**, v. 220, n. 1, p. 30–41, 2011.

BONILLA-RAMIREZ, L.; JIMENEZ-DEL-RIO, M.; VELEZ-PARDO, C. Acute and chronic metal exposure impairs locomotion activity in *Drosophila melanogaster*: A model to study Parkinsonism. **BioMetals**, v. 24, n. 6, p. 1045–1057, 2011.

BOONLAI, W. et al. The effect of the preservative methylparaben on the thermoresponsive gelation behavior of aqueous solutions of poloxamer 407. **Journal of Molecular Liquids**, v. 240, p. 622–629, 2017.

BROSS, T. G.; ROGINA, B.; HELFAND, S. L. Behavioral, physical, and demographic changes in *Drosophila* populations through dietary restriction. **Ageing Cell**, v. 4, n. 6, p. 309–317, 2005.

CABALLERO-DÍAZ, E.; VALCÁRCEL CASES, M. Analytical methodologies for nanotoxicity assessment. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 84, p. 160–171, 2016.

CAI, Z. Role of berberine in Alzheimer ' s disease. **Neuropsychiatric Disease and Treatment**, v. 12, p. 2509–2520, 2016.

CAMBRUSSI, A. N. C. O. et al. The role of nanotechnology in reducing oxidative stress: a review Anallyne. **Informative Geum Bulletin**, v. 9, n. 2, p. 1–11, 2018.

CARAMELLA, C. M. et al. Mucoadhesive and thermogelling systems for vaginal drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 92, p. 39–52, 2015.

CARMICHAEL, O.; LOCKHART, S. Neurotrophins and. **Brain Imaging in Behavioral Neuroscience**, n. November 2011, p. 289–320, 2012.

CHANG, H. et al. Overexpression of the *Drosophila* vesicular monoamine transporter

increases motor activity and courtship but decreases the behavioral response to cocaine. **Molecular Psychiatry**, p. 1–15, 2006.

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.

CHEN, K. et al. Berberine reduces ischemia/reperfusion-induced myocardial apoptosis via activating AMPK and PI3K-Akt signaling in diabetic rats. **Apoptosis**, v. 19, n. 6, p. 946–957, 2014.

CHEN, Y.; AMREIN, H. Ionotropic Receptors Mediate Drosophila Oviposition Preference through Sour Gustatory Receptor Neurons. **Current Biology**, v. 27, n. 18, p. 2741–2750.e4, 2017.

CHIN, S. G. et al. Olfactory Neurons and Brain Centers Directing Oviposition Decisions in Drosophila. **Cell Reports**, v. 24, n. 6, p. 1667–1678, 2018.

CHIU, J. C. et al. Assaying Locomotor Activity to Study Circadian Rhythms and Sleep Parameters in Drosophila. **Journal of Visualized Experiments**, n. September, p. 1–8, 2010.

CHU, M. et al. Role of berberine in anti-bacterial as a high-affinity LPS antagonist binding to TLR4 / MD-2 receptor. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 14, p. 1–8, 2014.

CODEVILLA, C. F. ET AL. Nanoestruturas contendo compostos bioativos extraídos de plantas. **Ciência e Natura**, v. 37, p. 142–151, 2015.

COULOM, H.; BIRMAN, S. Chronic exposure to rotenone models sporadic Parkinson's disease in Drosophila melanogaster. **Journal of Neuroscience**, v. 24, n. 48, p. 10993–10998, 2004.

DE SÁ, I. S. NANOENCAPSULAÇÃO DE CURCUMINA E AVALIAÇÃO in vitro DA ATIVIDADE DAS ENZIMAS AChE, BChE E GST EM TECIDOS BIOLÓGICOS DE Drosophila melanogaster. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 53, n. 9, p. 1689–1699, 2019.

DEWAN, M. et al. International Journal of Biological Macromolecules Effect of methyl cellulose on gelation behavior and drug release from poloxamer based ophthalmic formulations. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 72, p. 706–710, 2015.

DHAWAN, A. et al. Aneugenic and clastogenic effects of doxorubicin in human lymphocytes. **Mutagenesis**, v. 18, n. 6, p. 487–490, 2003.

DÍAZ, M. S.; FREILE, M. L.; GUTIÉRREZ, M. I. Solvent effect on the UV/Vis absorption and fluorescence spectroscopic properties of berberine. **Photochemical and**

- Photobiological Sciences**, v. 8, n. 7, p. 970–974, 2009.
- DINUNZIO, J. C. et al. Applications of KinetiSol® Dispersing for the production of plasticizer free amorphous solid dispersions. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 40, n. 3, p. 179–187, 2010.
- DOKE, S. K.; DHAWALE, S. C. Alternatives to animal testing: A review. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 23, n. 3, p. 223–229, 2015.
- EI-BADRY, M. E. A. PERFORMANCE OF POLOXAMER 407 AS HYDROPHILIC CARRIER ON THE BINARY MIXTURES WITH NIMESULIDE Introduction problems related to poor water solubility , low bioavailability and stability of drugs and difficulty in completely removing liquid solvent [7 , 8]. **Farmacia**, v. 61, n. 6, p. 1137–1150, 2013.
- ELLMAN, G. L. Tissue Sulfyd Groups. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 7, p. 70–77, 1959.
- ELOY, J. D. O. et al. *Quim. Nova*, v. 35, n. 5, p. 1036–1040, 2012.
- EOM, H. J. et al. Inhalation toxicity of indoor air pollutants in *Drosophila melanogaster* using integrated transcriptomics and computational behavior analyses. **Scientific Reports**, v. 7, n. June, p. 1–15, 2017.
- FAKHARI, A.; CORCORAN, M.; SCHWARZ, A. Thermogelling properties of purified poloxamer 407. **Heliyon**, v. 3, n. 8, p. e00390, 2017.
- FERY-FORGUES, S. A comparative study of nine berberine salts in the solid state : optimization of the photoluminescence and self-association properties through the choice. **Journal is@the Owner Societies**, n. 24 october, p. 3–10, 2016.
- FOLEY, P. A.; LUCKINBILL, L. S. The effects of selection for larval behavior on adult life-history features in *Drosophila melanogaster*. **Evolution**, v. 55, n. 12, p. 2493–2502, 2001.
- GERSHANIK, T.; BENITA, S. Self-dispersing lipid formulations for improving oral absorption of lipophilic drugs. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 50, n. 1, p. 179–188, 2000.
- GURUNATH, S. et al. Amorphous solid dispersion method for improving oral bioavailability of poorly water-soluble drugs. **JOPR: Journal of Pharmacy Research**, v. 6, n. 4, p. 476–480, 2013.
- HANCOCK, B. C. Disordered drug delivery: Destiny, dynamics and the Deborah number. **Pharmaceutical Journal**, v. 267, n. 7169, p. 520, 2001.
- HARISH, G. et al. Bioconjugates of curcumin display improved protection against glutathione depletion mediated oxidative stress in a dopaminergic neuronal cell line: Implications for Parkinson's disease. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 18, n. 7, p. 2631–2638, 2010.

HE, X.; HWANG, H. M. Nanotechnology in food science: Functionality, applicability, and safety assessment. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 24, n. 4, p. 671–681, 2016.

HIRTH, F. Drosophila melanogaster in the Study of Human Neurodegeneration. **CNS & Neurological Disorders - Drug Targets**, v. 9, n. 4, p. 504–523, 2012.

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.

INGKANINAN, K. et al. Acetylcholinesterase inhibitors from *Stephania venosa* tuber. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 58, n. 5, p. 695–700, 2006.

J. AZMIR, ET AL. Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. **Journal of Food Engineering**, p. 1–12, 2013.

JAVAD-MOUSAVI, S. A. et al. ScienceDirect Protective effect of *Berberis vulgaris* fruit extract against Paraquat-induced pulmonary fibrosis in rats. **Biomedicine et Pharmacotherapy**, v. 81, p. 329–336, 2016.

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.

JIMENEZ-DEL-RIO, M.; GUZMAN-MARTINEZ, C.; VELEZ-PARDO, C. The effects of polyphenols on survival and locomotor activity in *drosophila melanogaster* exposed to iron and paraquat. **Neurochemical Research**, v. 35, n. 2, p. 227–238, 2010.

KHAN, A. W. et al. Enhanced dissolution and bioavailability of grapefruit flavonoid Naringenin by solid dispersion utilizing fourth generation carrier. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 9045, p. 1–8, 2014.

KHEIR, M. M. et al. Author's personal copy Acute toxicity of berberine and its correlation with the blood concentration in mice. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, n. 4, 2010.

KIM, M. S. et al. Enhanced bioavailability of sirolimus via preparation of solid dispersion nanoparticles using a supercritical antisolvent process. **International Journal of Nanomedicine**, v. 6, p. 2997–3009, 2011.

KIM, S. J. et al. A novel composition of ticagrelor by solid dispersion technique for increasing solubility and intestinal permeability. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 555, n. October 2018, p. 11–18, 2019.

KIM, Y. H.; LEE, S. H. Invertebrate acetylcholinesterases: Insights into their evolution and non-classical functions. **Journal of Asia-Pacific Entomology**, v. 21, n. 1, p. 186–195, 2018.

- KLIMACZEWSKI, C. V. et al. Biomedicine & Pharmacotherapy Peumus boldus attenuates copper-induced toxicity in *Drosophila melanogaster*. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 97, n. May 2017, p. 1–8, 2018.
- KLOUDA, L. Thermoresponsive hydrogels in biomedical applications A seven-year update. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 97, p. 338–349, 2015.
- KUMAR, P. et al. Nanotechnology and its challenges in the food sector: a review. **Materials Today Chemistry**, v. 17, p. 100332, 2020.
- KUROIWA, Y. et al. Nano-scale and molecular-level understanding of wet-milled indomethacin/poloxamer 407 nanosuspension with TEM, suspended-state NMR, and Raman measurements. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 537, n. 1–2, p. 30–39, 2018.
- LACERDA, C. D. et al. Produção de nanopartículas de quitosana reticulada com tripolifosfato para aplicação biotecnológica. **18ª Semana de Pesquisa da Universidade Tiradentes**, v. 1, p. 4, 2016.
- LEE, K. S. et al. Curcumin extends life span, improves health span, and modulates the expression of age-associated aging genes in *drosophila melanogaster*. **Rejuvenation Research**, v. 13, n. 5, p. 561–570, 2010.
- LEIMANN, F. V. et al. Caracterização de nanopartículas blenda poliméricas biodegradáveis contendo progesterona. **Ciencia Rural**, v. 45, n. 11, p. 2082–2088, 2015.
- LI, G. et al. Preparation and in vitro-in vivo evaluation of intestinal retention pellets of Berberine chloride to enhance hypoglycemic and lipid-lowering efficacy. **Asian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 14, n. 5, p. 559–568, 2019a.
- LI, J. et al. Anti-fatigue activity of polysaccharide fractions from *Lepidium meyenii* Walp. (maca). **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 95, p. 1305–1311, 2017a.
- LI, J. et al. Amorphous solid dispersion of berberine mitigates apoptosis via iPLA2 β /cardiolipin/opa1 pathway in db/db mice and in palmitate-treated MIN6 β -cells. **International Journal of Biological Sciences**, v. 15, n. 7, p. 1533–1545, 2019b.
- LI, X. et al. Generation of a whole-brain atlas for the cholinergic system and mesoscopic projectome analysis of basal forebrain cholinergic neurons. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 115, n. 2, p. 415–420, 2017b.
- LIAQUAT, L. et al. **Naringenin-induced enhanced antioxidant defence system meliorates cholinergic neurotransmission and consolidates memory in male rats.** [s.l.] Elsevier Inc, 2018. v. 194
- LIN, Y. et al. Spectral Analysis of Nanodiamond-Berberine Complex Interaction with Living

Cells for Nanoparticle Mediated Drug Delivery. **Journal of Biomedical Photonics & Engineering**, n. May, 2017.

LIU, C. S. et al. Research progress on berberine with a special focus on its oral bioavailability. **Fitoterapia**, v. 109, p. 274–282, 2016.

LIU, Y. et al. Diphenyltetrazolium Bromide (MTT) Reduction. **Journal of Neurochemistry**, v. 6, n. 3, p. 1–13, 1997.

LOIZZO, M. et al. Natural Products and their Derivatives as Cholinesterase Inhibitors in the Treatment of Neurodegenerative Disorders: An Update. **Current Medicinal Chemistry**, v. 15, n. 12, p. 1209–1228, 2008.

LU, J. et al. Berberine regulates neurite outgrowth through AMPK-dependent pathways by lowering energy status. **Experimental Cell Research**, v. 334, n. 2, p. 194–206, 2015.

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, n. 1, p. 27–34, 2011.

MAGALHÃES, W. L. E.; THÁ, E. L.; LEME, D. M. Comunicado Técnico 427 - Método de determinação de concentrações não citotóxicas para avaliação da capacidade protetora da lignina contra danos ao DNA. **EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária**, n. Dezembro, p. 10, 2018.

MANAGA, M. et al. Effects of Pluronic F127 micelles as delivering agents on the vitro dark toxicity and photodynamic therapy activity of carboxy and pyrene substituted porphyrins. **Polyhedron**, v. 152, p. 102–107, 2018.

MARTIN, J. A portrait of locomotor behaviour in Drosophila determined by a video-tracking paradigm. **Behavioural Processes**, v. 67, p. 1–13, 2004.

MCCUBREY, J. A. et al. Effects of resveratrol, curcumin, berberine and other nutraceuticals on aging, cancer development, cancer stem cells and microRNAs. **Aging**, v. 9, n. 6, p. 1477–1536, 2017.

MEDAREVIĆ, D. P. et al. Dissolution rate enhancement and physicochemical characterization of carbamazepine-ploxamer solid dispersions. **Pharmaceutical Development and Technology**, v. 21, n. 3, p. 268–276, 2016.

MELO, N. F. S. ET AL. DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOCÁPSULAS DE POLI (L-LACTÍDEO) CONTENDO BENZOCAÍNA. **Quimica Nova**, v. 33, n. 1, p. 65–69, 2010.

MIROŃCZUK-CHODAKOWSKA, I.; WITKOWSKA, A. M.; ZUJKO, M. E. Endogenous non-enzymatic antioxidants in the human body. **Advances in Medical Sciences**, v. 63, n. 1, p.

68–78, 2018.

MOOTER, G. VAN DEN et al. Evaluation of Inutec SP1 as a new carrier in the formulation of solid dispersions for poorly soluble drugs. v. 316, p. 1–6, 2006.

MOTALLAE, S.; TAHERI, A.; HOMAYOUNI, A. Preparation and characterization of solid dispersions of celecoxib obtained by spray-drying ethanolic suspensions containing PVP-K30 or isomalt. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 46, n. May, p. 188–196, 2018.

MÜLHAUPT, R. Green polymer chemistry and bio-based plastics: Dreams and reality. **Macromolecular Chemistry and Physics**, v. 214, n. 2, p. 159–174, 2013.

N. GOULART, P. et al. Butyrylcholinesterase - BuChE: A Potential Target for Development of Drugs for Alzheimer's Disease Treatment. **Revista Virtual de Química**, v. 13, n. 1, p. 1–37, 2020.

NARCISO, E. S.; NAKAGAWA, L. E. Análise De Praguicidas Por Bioensaio Com Mosca Drosophila Melanogaster E Cromatografia Em Camada Delgada. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 76, n. 2, p. 313–316, 2009.

NAVROTSKAYA, V. et al. Berberine Attenuated Aging-Accelerating Effect of High Temperature in Drosophila Model. **American Journal of Plant Sciences**, v. 05, n. 03, p. 275–278, 2014.

NAVROTSKAYA, V. V. et al. Berberine Prolongs Life Span and Stimulates Locomotor Activity of <i>Drosophila melanogaster</i>. **American Journal of Plant Sciences**, v. 03, n. 07, p. 1037–1040, 2012.

O'KANE, C. J. Drosophila as a model organism for the study of neuropsychiatric disorders. **Current Topics in Behavioral Neurosciences**, 2011.

OMAR, S. H. et al. PT. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 47, p. 1–27, 2017.
ONG, C. et al. Drosophila melanogaster as a model organism to study nanotoxicity. **Nanotoxicology**, v. 9, n. 3, p. 396–403, 2015.

OYETAYO, B. O. et al. Ameliorative role of diets fortified with Curcumin in a Drosophila melanogaster model of aluminum chloride-induced neurotoxicity. **Journal of Functional Foods**, v. 71, n. December 2019, p. 1–7, 2020.

PANDEY, G. et al. Altitudinal variation of berberine, total phenolics and flavonoid content in *Thalictrum foliolosum* and their correlation with antimicrobial and antioxidant activities. **Journal of Ayurveda and Integrative Medicine**, v. 9, n. 3, p. 169–176, 2018.

PANDEY, U. B.; NICHOLS, C. D. Human Disease Models in Drosophila melanogaster and the Role of the Fly in Therapeutic Drug Discovery. **The American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 63, n. 2, p. 411–436, 2011.

PARK, J. H. et al. Neuroprotective properties of phytochemicals against paraquat-induced

oxidative stress and neurotoxicity in *Drosophila melanogaster*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 104, n. 2, p. 118–125, 2012.

PATEL, H. R.; PATEL, R. P.; PATEL, M. M. Poloxamers: A pharmaceutical excipients with therapeutic behaviors. **International Journal of PharmTech Research**, v. 1, n. 2, p. 299–303, 2009.

PATEL, P. V.; PANCHAL, S. S.; MEHTA, T. A. Improvement of dissolution rate of tacrolimus by solid dispersion technique. **Journal of Pharmaceutical Investigation**, v. 43, n. 1, p. 45–53, 2013.

PATHAKOTI, K.; MANUBOLU, M.; HWANG, H. ScienceDirect Nanostructures : Current uses and future applications in food science. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 25, p. 1–9, 2017.

PAULA, M. T. et al. Effects of Hg(II) Exposure on MAPK Phosphorylation and Antioxidant System in *D. melanogaster*. **Environmental Toxicology**, 2014.

PEREIRA, G. G, KECHINSKI, C. P. ET AL. FORMULATION AND CHARACTERIZATION OF POLOXAMER 407®: THERMOREVERSIBLE GEL CONTAINING POLYMERIC MICROPARTICLES AND HYALURONIC ACID. **Química Nova**, v. 36, n. 8, p. 1121–1125, 2013.

PISOSCHI, A. M. et al. AC SC. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 157, p. 1326–1345, 2018.

POETINI, M. R. ET AL. Hesperidin Protects Against Mortality, Locomotor Deficits and Oxidative Stress in *Drosophila melanogaster* Model of Iron-Induced Neurotoxicity. **Laboratório de Avaliações Farmacológicas e Toxicológicas Aplicadas às Moléculas Bioativas- LaftamBio Pampa**, p. 38–83, 2017.

POPE, C. N.; BRIMIJOIN, S. Version of Record: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006295218300509>. **Biochemical Pharmacology**, v. 153, p. 205–216, 2018.

PRASAD, S. N. Neuroprotective effect of geraniol and curcumin in an acrylamide model of neurotoxicity in *Drosophila melanogaster* : Relevance to neuropathy q. **Journal of Insect Physiology**, v. 60, p. 7–16, 2014.

PRÜSSING, K.; VOIGT, A.; SCHULZ, J. B. *Drosophila melanogaster* as a model organism for Alzheimer's disease. **Molecular Neurodegeneration**, v. 8, n. 1, 2013.

RAND, M. D. Drosophotoxicology: The growing potential for *Drosophila* in neurotoxicology. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 32, n. 1, p. 74–83, 2010.

REZAEI, A.; FATHI, M.; JAFARI, S. M. Nanoencapsulation of hydrophobic and low-soluble food bioactive compounds within different nanocarriers. **Food Hydrocolloids**, v. 88, n. September 2018, p. 146–162, 2019.

REZAUL, M. et al. Food Technology and Equipment , Key Laboratory for Agro-Products Postharvest Handling. **Trends in Food Science & Technology**, v. 78, n. 34–70, 2018.

ROCHA, L. D. L. E S. et al. Drosophila: um importante modelo biológico para a pesquisa e o ensino de Genética. **Scire Salutis**, v. 3, n. 1, p. 37–48, 2013.

SAHIBZADA, M. U. K. et al. Bioavailability and hepatoprotection enhancement of berberine and its nanoparticles prepared by liquid antisolvent method. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 28, n. 1, p. 327–332, 2021.

SALARI, R. et al. Characterization of encapsulated berberine in yeast cells of *Saccharomyces cerevisiae*. **Iranian Journal of Pharmaceutical Research**, v. 14, n. 4, p. 1247–1256, 2015.

SCHAFFAZICK, S. R. et al. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Química Nova**, v. 26, n. 5, p. 726–737, 2003.

SCIENCE, I.; SCIENCE, I. Minamiashigara-City, Kanagawa 250-01,. **Interface**, v. 28, p. 65–108, 1987.

SHARMA, A. et al. Validation and application of *Drosophila melanogaster* as an in vivo model for the detection of double strand breaks by neutral Comet assay. **Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 721, n. 2, p. 142–146, 2011.

SHI, C. et al. Preparation, characterization and in vivo studies of amorphous solid dispersion of berberine with hydrogenated phosphatidylcholine. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 74, p. 11–17, 2015.

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, n. December 2018, p. 29–37, 2019.

SNEŽŽANA MILJANIĆ, LEO FRKANEC, TOMISLAV BILJAN, 3 ZLATKO MEIĆ MLADEN ŽINI Ć. Recent Advances in linear and nonlinear Raman spectroscopy I. **Journal of Raman Spectroscopy**, v. 38, n. April, p. 1538–1553, 2007.

SOLANKI, R.; PATEL, K.; PATEL, S. Bovine Serum Albumin Nanoparticles for the Efficient Delivery of Berberine: Preparation, Characterization and In vitro biological studies. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 608, n. August 2020, p. 125501, 2021.

SZUTS, A. et al. Applicability of sucrose laurate as surfactant in solid dispersions prepared by melt technology. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 410, n. 1–2, p. 107–110, 2011.

- TANG, J. et al. Berberine and Coptidis Rhizoma as novel antineoplastic agents: A review of traditional use and biomedical investigations. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 126, n. 1, p. 5–17, 2009.
- TANTISHAIYAKUL, V.; KAEWNOPPARAT, N.; INGKATAWORNWONG, S. Properties of solid dispersions of piroxicam in polyvinylpyrrolidone. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 181, n. 2, p. 143–151, 1999.
- TAYLOR, P.; BUNACIU, A. A.; ABOUL-ENEIN, H. Y. Application of Fourier Transform Infrared Spectrophotometry in Pharmaceutical Drugs Analysis Application of Fourier Transform Infrared Spectrophotometry in Pharmaceutical. **New York University**, n. April 2013, p. 37–41, 2010.
- TICE, R. R. et al. Single cell gel/comet assay: Guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 35, n. 3, p. 206–221, 2000.
- TICKOO, S.; RUSSELL, S. Drosophila melanogaster as a model system for drug discovery and pathway screening. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 2, n. 5, p. 555–560, 2002.
- TRIVEDI, S. et al. 5-Desmethylnobiletin augments synaptic ACh levels and nicotinic ACh receptor activity: A potential candidate for alleviation of cholinergic dysfunction. **Neuroscience Letters**, v. 657, p. 84–90, 2017.
- VAN DEN MOOTER, G. The use of amorphous solid dispersions: A formulation strategy to overcome poor solubility and dissolution rate. **Drug Discovery Today: Technologies**, v. 9, n. 2, p. e79–e85, 2012.
- VASCONCELOS, T.; SARMENTO, B.; COSTA, P. Solid dispersions as strategy to improve oral bioavailability of poor water soluble drugs. **Drug Discovery Today**, v. 12, n. 23–24, p. 1068–1075, 2007.
- VILELA, C. R.; MORI, L. The invasive spotted-wing Drosophila (Diptera, Drosophilidae) has been found in the city of São Paulo (Brazil). **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 58, n. 4, p. 371–375, 2014.
- VO, C. L. N.; PARK, C.; LEE, B. J. Current trends and future perspectives of solid dispersions containing poorly water-soluble drugs. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 85, n. 3 PART B, p. 799–813, 2013.
- VUDDANDA, P. R. et al. Investigations on Agglomeration and Haemocompatibility of Vitamin E TPGS Surface Modified Berberine Chloride Nanoparticles. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 1–11, 2014.
- WANG, H. et al. Metformin and berberine, two versatile drugs in treatment of common metabolic diseases. **Oncotarget**, v. 9, n. 11, p. 10135–10146, 2018.
- WANG, X.; MICHOEL, A.; VAN DEN MOOTER, G. Solid state characteristics of ternary

solid dispersions composed of PVP VA64, Myrj 52 and itraconazole. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 303, n. 1–2, p. 54–61, 2005.

WANG, Z. et al. Investigation of the antioxidant and aldose reductase inhibitory activities of extracts from Peruvian tea plant infusions. **Food Chemistry**, v. 231, p. 222–230, 2017.

WILLIAMS, J. A. et al. Interaction between sleep and the immune response in *Drosophila*: A role for the NF κ B relish. **Sleep**, v. 30, n. 4, p. 389–400, 2007.

XU, H. et al. Extended tacrolimus release via the combination of lipid-based solid dispersion and HPMC hydrogel matrix tablets. **Asian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 14, n. 4, p. 445–454, 2019.

XU, R. Progress in nanoparticles characterization: Sizing and zeta potential measurement. **Particuology**, v. 6, n. 2, p. 112–115, 2008.

XU, W. J. et al. Enhanced dissolution and oral bioavailability of valsartan solid dispersions prepared by a freeze-drying technique using hydrophilic polymers. **Drug Delivery**, v. 23, n. 1, p. 41–48, 2016.

YANG, S. Y. et al. Optimization of Maillard reaction with ribose for enhancing anti-allergy effect of fish protein hydrolysates using response surface methodology. **Food Chemistry**, v. 176, p. 420–425, 2015.

YIN, J.; XING, H.; YE, J. Efficacy of berberine in patients with type 2 diabetes mellitus. **Metabolism: Clinical and Experimental**, v. 57, n. 5, p. 712–717, 2008.

ZHANG, J. et al. HHS Public Access. p. 1–29, 2016.

ZHANG, Y. et al. Ac ce p cr t. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 59, p. 363–371, 2013.

ZHANG, Z. et al. Solid dispersion of berberine-phospholipid complex/TPGS 1000/SiO₂: Preparation, characterization and in vivo studies. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 465, n. 1–2, p. 306–316, 2014.

ZHAOJIE, M. et al. Amorphous solid dispersion of berberine with absorption enhancer demonstrates a remarkable hypoglycemic effect via improving its bioavailability. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 467, n. 1–2, p. 50–59, 2014.

ZHU, F.; QIAN, C. Berberine chloride can ameliorate the spatial memory impairment and increase the expression of interleukin-1 beta and inducible nitric oxide synthase in the rat model of Alzheimer's disease. **BMC Neuroscience**, v. 7, p. 1–9, 2006.