

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

VIVIANE AUGUSTA DE MEDEIROS GARCIA CUNHA

**OBTENÇÃO DE DISPERSÕES SÓLIDAS CONTENDO NARINGENINA E  
AVALIAÇÃO *in vitro*, *in vivo* e *ex vivo* DA MODULAÇÃO DAS ENZIMAS DO  
SISTEMA COLINÉRGICO**

**CAMPO MOURÃO**

**2022**

VIVIANE AUGUSTA DE MEDEIROS GARCIA CUNHA

**OBTENÇÃO DE DISPERSÕES SÓLIDAS CONTENDO NARINGENINA E  
AVALIAÇÃO *in vitro*, *in vivo* e *ex vivo* DA MODULAÇÃO DAS ENZIMAS DO  
SISTEMA COLINÉRGICO**

**OBTAINING SOLID DISPERSIONS CONTAINING NARINGENIN AND  
EVALUATION *in vitro*, *in vivo* and *ex vivo* OF THE MODULATION OF ENZYMES  
OF THE CHOLINERGIC SYSTEM**

Dissertação apresentada como requisito para obtenção do título de Mestre em Tecnologia de Alimentos da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR.

Orientador: Prof. Dr. Odinei Hess Gonçalves.

Coorientadora: Dra. Vanessa Kaplum Foleis.

**CAMPO MOURÃO**

**2022**



Esta licença permite remixe, adaptação e criação a partir do trabalho, para fins não comerciais, desde que sejam atribuídos créditos ao(s) autor(es). Conteúdos elaborados por terceiros, citados e referenciados nesta obra não são cobertos pela licença.



Ministério da Educação  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná  
Campus Medianeira



---

VIVIANE AUGUSTA DE MEDEIROS GARCIA CUNHA

**OBTENÇÃO DE DISPERSÕES SÓLIDAS CONTENDO NARINGENINA E AVALIAÇÃO IN VITRO, IN VIVO E EX VIVO DA MODULAÇÃO DAS ENZIMAS DO SISTEMA COLINÉRGICO**

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

Data de aprovação: 31 de Maio de 2022

Odinei Hess Goncalves, - Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Ana Paula Peron, - Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Dr. Gustavo Petri Guerra, Doutorado - Fundação Universidade Federal do Pampa - Unipampa (Unipampa)

Documento gerado pelo Sistema Acadêmico da UTFPR a partir dos dados da Ata de Defesa em 31/05/2022.

**Campo Mourão  
2022**

## **Agradecimentos**

Agradeço primeiramente a Deus pela vida e por tudo que me tem dado. Agradeço ao meu esposo e minha filha que sempre estiveram me apoiando e me mantendo firme nessa conquista.

Agradeço aos meus pais, sogros, cunhadas e cunhados pela rede apoio em todo tempo que precisei.

Agradeço aos amigos em especial a Valeria Maria Costa Teixeira e Dayane Alves Leão pelo apoio e conselhos.

Agradeço a Bruna Franzon Rossi pela contribuição e ajuda no desenvolvimento dos resultados. Aos demais alunos do programa que também apoiaram e ajudaram no desenvolvimento do trabalho.

Agradeço aos professores e em especial ao meu orientador Professor Dr. Odinei Hess Gonçalves e doutora Vanessa Kaplum Foleis por contribuírem diretamente para a eficácia do trabalho.

Agradeço a Universidade Federal Tecnológica do Paraná Campus de Campo Mourão pela concessão da bolsa de Recursos Próprios do Campus que fomentou a realização da pesquisa.

*Dedico esse trabalho em memória de José Augusto de Medeiros e Maria da Luz de Paula Medeiros meus amados avós que além de ótimos exemplos de pessoas foram minha inspiração.*

## RESUMO

A naringenina é um flavonoide derivado da naringina, sendo considerado um polifenol glicosado da classe dos flavanonas presentes em plantas cítricas como a toranja (*Citrus paradisi*). Ela apresenta propriedades antioxidantes, e estudos recentes sugerem sua eficácia em tratamentos de patologias relacionadas ao sistema nervoso central como isquemia cerebral. A inibição reversível da atividade da acetilcolinesterase (AChE) e butirilcolinesterase (BChE) decorrente da ação da naringenina revelam o potencial desta para o tratamento de doenças do sistema nervoso, como a Doença de Alzheimer. Porém, sua baixa afinidade pela água torna seu uso em alimentos aquosos um desafio tecnológico e os métodos de obtenção de dispersões sólidas tem se mostrado eficazes para contornar tais pontos negativos da naringenina. Contudo, faz-se necessário avaliar como a encapsulação pode afetar a atividade da naringenina. O presente trabalho avalia a ação da naringenina e dispersões sólidas contendo naringenina sobre as enzimas do sistema colinérgico em ensaios *in vitro*, *in vivo* e *ex vivo*. A dispersão sólida foi caracterizada por Calorimetria de Varredura Diferencial (DSC) e por Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR). Os ensaios *in vitro* analisaram a atividade e a cinética das enzimas AChE e BChE utilizando o método de Ellman modificado. As análises *in vivo* foram realizadas em *Drosophila melanogaster* (DM) realizando o teste de taxa de sobrevivência e análises *ex vivo* da atividade das enzimas AChE e BChE através do método Ellman modificado, além das atividades das enzimas catalase e superóxido dismutase. Os resultados de caracterização da dispersão sólida sugerem que a nanoencapsulação da naringenina ocorreu de forma satisfatória. Os ensaios *in vitro* realizados demonstraram que ocorreu inibição não-competitiva da naringenina em relação às enzimas AChE e BChE, apresentando valores de IC<sub>50</sub> para a enzima AChE de 99,4 µM e para a BChE de 627,6 µM. O ensaio de taxa de sobrevivência demonstrou que tanto a naringenina livre quanto a dispersão sólida não promoveram alteração no tempo de vida das DM, indicando baixa toxicidade. Os ensaios *ex vivo* de DM frente às enzimas AChE e BChE não apresentaram atividade de inibição da naringenina, contudo as análises com catalase e superóxido dismutase confirmaram a atividade antioxidante da naringenina também encontrada na literatura. Portanto os resultados obtidos da caracterização da técnica de dispersão sólida na produção de nanopartículas contendo naringenina mostraram a eficiência a encapsulação bem como os resultados das enzimas AChE e BChE frente a naringenina livre confirmaram a inibição destas enzimas. A naringenina então apresentou resultados

que corroboram com a literatura e contribui para futuras pesquisas para sua utilização em alimentos.

**Palavras-chave:** naringenina; nanopartículas; dispersão sólida; acetilcolinesterase; butirilcolinesterase.

## ABSTRACT

Naringenin is a flavonoid derived from naringin, being considered a glycosylated polyphenol of the flavanone class present in citrus plants such as grapefruit (*Citrus paradisi*). It has antioxidant properties, and recent studies suggest its effectiveness in treating pathologies related to the central nervous system such as cerebral ischemia. The reversible inhibition of acetylcholinesterase (AChE) and butyrylcholinesterase (BChE) activity resulting from the action of naringenin reveals its potential for the treatment of diseases of the nervous system, such as Alzheimer's disease. Its low affinity for water makes its use in aqueous foods a technological challenge and methods for obtaining solid dispersions have been shown to be effective in overcoming such negative aspects of naringenin. However, it is necessary to assess how encapsulation can affect naringenin activity. The present work evaluates the action of naringenin and solid dispersions containing naringenin on the enzymes of the cholinergic system in *in vitro*, *in vivo* and *ex vivo* assays. The solid dispersion was characterized by Differential Scanning Calorimetry (DSC) and by Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR). *In vitro* assays analyzed the activity and kinetics of AChE and BChE enzymes using the modified Ellman method. *In vivo* analyzes were performed on *Drosophila melanogaster* (DM) performing the survival rate test and *ex vivo* analysis of AChE and BChE enzyme activity using the modified Ellman method, in addition to catalase and superoxide dismutase enzyme activities. The solid dispersion characterization results suggest that the nanoencapsulation of naringenin occurred satisfactorily. The *in vitro* assays performed showed that there was a non-competitive inhibition of naringenin in relation to the AChE and BChE enzymes, presenting IC<sub>50</sub> values for the AChE enzyme of 99.4  $\mu\text{M}$  and for the BChE of 627.6  $\mu\text{M}$ . The survival rate assay showed that both free naringenin and solid dispersion did not change the lifespan of DM, indicating low toxicity. The *ex vivo* DM assays against AChE and BChE enzymes did not show naringenin inhibition activity, however the analyzes with catalase and superoxide dismutase confirmed the antioxidant activity of naringenin also found in the literature. Therefore, the results obtained from the characterization of the solid dispersion technique in the production of nanoparticles containing naringenin showed the efficiency of encapsulation as well as the results of AChE and BChE enzymes against free naringenin confirmed the inhibition of these enzymes. Naringenin then presented results that corroborate the literature and contribute to future research for its use in foods.

**Keywords:** naringenin; nanoparticles; solid dispersion; acetylcholinesterase; butyrylcholinesterase.



## SUMÁRIO

<b>CAMPO MOURÃO .....</b>	<b>13</b>
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>6</b>
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>14</b>
2.1. Objetivo geral .....	14
2.2. Objetivo específicos .....	14
<b>3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>15</b>
3.1. Naringenina .....	15
3.2. Encapsulação da naringenina .....	16
3.3. Dispersão Sólida.....	17
3.4. Sistema Colinérgico .....	18
<b>3.5 Atividade Enzimática .....</b>	<b>20</b>
3.5.1. Cinética Enzimática.....	20
3.5.2 Equações de Michaelis-Menten e de Lineweaver-Burk .....	22
3.5.3. Inibidores Enzimáticos .....	23
<b>3.6. Enzimas oxidativas .....</b>	<b>25</b>
<b>3.7. <i>Drosophila melanogaster</i>.....</b>	<b>26</b>
4.1. Material .....	27
4.2. Atividade e cinética enzimática <i>in vitro</i> da acetilcolinesterase (AChE).....	27
4.3. Atividade e cinética enzimática <i>in vitro</i> da butirilcolinesterase (BChE) .....	28
4.4. Obtenção e caracterização da dispersão sólida contendo naringenina .....	29
<b>4.5. Experimentos <i>in vivo</i> .....</b>	<b>29</b>
4.5.1. Manutenção de <i>Drosophila melanogaster</i> .....	30
4.5.2. Taxa de sobrevivência .....	30
<b>4.6. Experimentos <i>ex vivo</i> .....</b>	<b>31</b>
4.6.2. Obtenção do homogeneizado de <i>Drosophila melanogaster</i> .....	31
4.6.3. Atividade da acetilcolinesterase (AChE) presente no homogeneizado de <i>D. melanogaster</i> .....	31
4.6.4. Atividade da butirilcolinesterase (BChE) presente no homogeneizado de <i>D. melanogaster</i> .....	31
4.6.5. Atividade inibitória da catalase (CAT) de homogeneizados de <i>Drosophila melanogaster</i> .....	32
4.6.6. Atividade inibitória da superóxido dismutase (SOD) de homogeneizados de <i>Drosophila melanogaster</i> .....	32
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>34</b>
5.1. Atividade e cinética da enzima AChE sob ação da naringenina.....	34
5.2. Atividade e cinética da enzima BChE sob ação da naringenina.....	36

5.3.	Caracterização das nanopartículas contendo naringenina .....	39
5.4.	Taxa de sobrevivência de <i>Drosophila melanogaster</i> (DM).....	41
5.5.	Atividade da acetilcolinesterase e butirilcolinesterase em homogeneizados de <i>Drosophila melanogaster</i> .....	42
5.6.	Atividade das enzimas oxidativas SOD e CAT em homogeneizados de <i>Drosophila melanogaster</i> .....	44
6.	CONCLUSÕES.....	47
	REFERÊNCIAS.....	48

## 1. INTRODUÇÃO

Os compostos fenólicos ou polifenóis possuem uma importante atuação na preservação dos alimentos, conferindo fotoproteção contra micro-organismos e insetos nas plantas, além de pigmentação e preservação de características organolépticas. Os flavonoides são compostos fenólicos amplamente distribuídos em vegetais, frutas, ervas e nozes e alimentos contendo flavonoides são amplamente consumidos por seres humanos (NAKAJIMA; MACEDO; MACEDO, 2014; PINHO-RIBEIRO et al., 2016). O estresse oxidativo é causado pelo excesso de radicais livres os quais alguns desses são espécies reativas de oxigênio (EROS) instáveis e altamente reativas, resultantes do processo metabólico aeróbico tradicional. O interesse pela atividade antioxidante de alguns compostos como os flavonoides têm crescido, pois dentre tantos efeitos benéficos também podem promover a inibição do surgimento de células tumorais, na prevenção do aparecimento de outros danos celulares resultantes do desbalanço reação oxidante REDOX (VELLOSA et al., 2021).

Estudos sugerem a utilização de naringenina em tratamentos de patologias relacionadas ao sistema nervoso central como isquemia cerebral (AHMAD et al., 2020) e como composto fitoterápico para tratamento do transtorno do espectro autista (BHANDARI; PALIWAL; KUHAD, 2018). Flavonoides como a naringenina apresentam também atividade inibitória das enzimas colinesterases, possibilitando efeitos associados a neuroproteção do tecido nervoso que sofre com o dano oxidativo. Inibidores de acetilcolinesterases (AChE) e butirilcolinesterase (BChE), que são enzimas analisadas para gerenciar condições neurodegenerativas, melhoram a comunicação entre as atividades da via colinérgica e as terminações nervosas (YENER et al., 2020)

Embora a naringenina possua uma ampla gama de atividades biológicas, estudos clínicos que exploram diferentes esquemas de administração desta droga encontram dificuldade na sua baixa solubilidade em água e baixa biodisponibilidade. A naringenina é solúvel em compostos orgânicos como etanol, dimetil formamida e dimetilsulfóxido, contudo ela apresenta-se pouco solúvel em tampões aquosos (JOSHI; KULKARNI; WAIRKAR, 2018a; KHAN et al., 2015)

A utilização de dispersões sólidas tem sido amplamente estudada para obter vantagens como maior solubilidade, redução da dose, alta biodisponibilidade e direcionamento da droga (ALMEIDA et al., 2018; JOSHI; KULKARNI; WAIRKAR, 2018). A dispersão sólida é uma técnica usada para melhorar a solubilidade e a taxa de dissolução de compostos bioativos pouco solúveis, através da utilização de um composto bioativo, um polímero, que funciona como um surfactante, é

preparado por método de fusão ou evaporação do solvente. Por meio da dispersão sólida, o composto bioativo pode ter sua forma cristalina alterada e formar ou alterar o tamanho das suas partículas ou ainda melhorar suas propriedades umectantes (HELENO et al., 2018; JOSHI; KULKARNI; WAIRKAR, 2018).

Existe a demanda por pesquisas que avaliam o potencial tóxico de compostos bioativos naturais que sejam transformadas por métodos ligados à Nanotecnologia para que estas sejam empregadas de forma segura na indústria alimentícia e farmacêutica. Estudos com organismos vivos como a mosca da fruta, *Drosophila melanogaster*, são amplamente utilizados pois possuem mecanismos metabólicos semelhantes ao ser humano, além da semelhança com a sequência genética humana (MENESES et al., 2019; LUSHCHAK et al., 2011).

Diante da atividade apresentada em estudos da naringenina em demais aplicações este estudo visa a apresentar os resultados da naringenina frente as enzimas do sistema colinérgico desenvolvendo também dispersões sólidas contendo naringenina afim de corroborar com os resultados benéficos já encontrados na literatura.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo geral

Avaliar a ação da naringenina, livre e na forma de dispersões sólidas, sobre as enzimas do sistema colinérgico por meio de ensaios *in vitro* e *ex vivo*, além de avaliar a taxa de sobrevivência de *Drosophila melanogaster* exposta a diferentes concentrações de naringenina.

### 2.2. Objetivo específicos

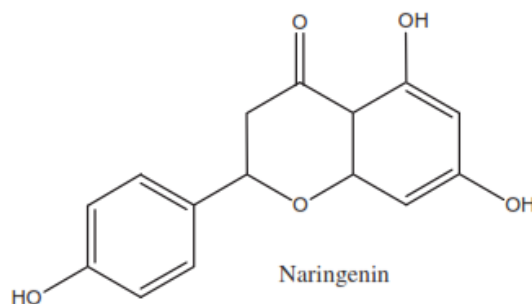
- Avaliar o efeito modulador da naringenina livre sobre as enzimas acetilcolinesterase (AChE) e butirilcolinesterase (BChE) em experimentos *in vitro*;
- Avaliar a cinética enzimática da acetilcolinesterase (AChE) e da butirilcolinesterase (BChE) na presença de naringenina livre em experimentos *in vitro*;
- Produzir dispersão sólidas contendo naringenina utilizando a Poloxamer 407 como polímero encapsulante;
- Caracterizar as dispersões sólidas por meio das técnicas Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC) e Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR);
- Avaliar o efeito da naringenina sobre a taxa de sobrevivência de *Drosophila melanogaster*;
- Avaliar os efeitos do homonegeizado de *Drosophila melanogaster* sobre a atividade das enzimas acetilcolinesterase (AChE) e butirilcolinesterase (BChE em experimentos *ex vivo*;
- Avaliar o efeito do homogeneizado de *Drosophila melanogaster* sobre a enzimas catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD) em experimentos *ex vivo*.

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1. Naringenina

A naringenina (Figura 1) é conhecida como 4',5,7-trihidroxiflavona 7-ramnoglicosídeo e contém a estrutura básica de um flavonoide, juntamente com duas unidades de ramnose ligadas à sua porção aglicona. Quando a naringina é glicosada pela atividade do complexo enzimático naringinase que é formado pela  $\alpha$ -L-ramnosidase e pela  $\beta$ -D-glucosidade, produz-se a naringenina (4'-5,7-tri-hidronofavonona) e glicose. A naringenina é incolor e insípida derivada do rápido metabolismo da naringina pelas enzimas hepáticas denominadas naringinase. A naringinase existe em leveduras, plantas e fungos, é comumente disponível no gênero *Aspergillus* e hidrolisa a naringina em naringenina, ramnose, glicose e prunina. Devido aos efeitos inibitórios da naringina sobre as enzimas hepáticas, o consumo de suco de toranja pode inibir o metabolismo ou aumentar a concentração de fármacos que são metabolizados no fígado, podendo alterar a farmacocinética e levar à toxicidade (MOGHADDAM et al., 2020; KARIM et al., 2018; RIBEIRO, 2011). A naringenina apresenta maior concentração nas partes sólidas das frutas em relação ao suco devido a sua distribuição depender das concentrações de biossíntese das enzimas (Amin et al., 2020).

**Figura 1: Estrutura química naringenina.**



Fonte: AMIN et al., (2020)

Os métodos tradicionais de extração e purificação da naringenina a partir de fontes naturais são limitados por alto custo, baixo rendimento e demandam alto tempo de extração. A produção de naringenina em microrganismos é, nesse sentido, recomendada como um dos métodos alternativos para obter alto rendimento com baixo custo (KARIM et al., 2018). Para fins comerciais ou científicos, a naringenina pode ser adquirida comercialmente com grau

analítico (KAPOOR et al., 2019; KUMAR et al., 2015). Embora Zhou et al. (2014) tenham avaliado que a naringenina é solúvel na composição binária água e etanol, a biodisponibilidade da naringenina é inferior a 5% quando administrada oralmente, e isto pode estar relacionado a sua solubilidade em condições naturais e sua suscetibilidade à degradação por fatores físico-químicos, como luz, calor, umidade e oxigênio.

Em relação à toxicidade da naringenina, estudos com anfíbios apresentaram resultados tóxicos com altas doses (10 mg/L). Sobre seus efeitos antiestrogênicos, a naringenina atua por meio de mecanismos mediados por receptores de estrogênio em concentrações testadas em ratos superiores a 40 mg/indivíduo apresentou toxicidade, não havendo relatos em testes com concentrações menores (AMIN et al., 2020). Outros testes em camundongos apresentam bons resultados com a concentração de 200 nmol/kg para a inibição de metástases pulmonares. (GALATI; O'BRIEN, 2004).

### **3.2. Encapsulação da naringenina**

Nanocápsulas são compostas por substâncias que funcionam como surfactantes ou polímeros que se misturam e melhoram a estabilidade de compostos e sua absorção (ALMEIDA et al., 2018b; BUDEL et al., 2020). A encapsulação pode possibilitar a preservação da atividade antioxidante das moléculas e proporciona seu consumo. Desta forma, pode garantir uma vida útil prolongada de algumas moléculas podendo evitar sabores desagradáveis como adstringência, amargura quando em alta concentração (KERDUDO et al., 2014).

Métodos de encapsulamento podem ser desenvolvidos com o intuito de proteger e aprimorar a atividade *in situ* desses compostos (BUDEL et al., 2020; KERDUDO et al., 2014). Estudos mostram que a naringenina encapsulada apresenta menor toxicidade que a sua forma livre (CHAURASIA et al., 2018). Testes em coelhos com degeneração macular relacionada à idade utilizaram naringenina nanoencapsulada em matrizes de éter sulfobutil-ciclodextrina e quitosana por gelificação iônica. As nanopartículas foram avaliadas em relação ao tamanho, potencial zeta, morfologia, além de caracterização por Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC). Observou-se que a solubilidade da naringenina aumentou consideravelmente com a utilização destes encapsulantes (ZHANG et al., 2016).

Quando nanoencapsulada em quitosana, alginato e sulfato de sódio com cloreto de cálcio como reticulante (MAITY et al., 2017), a naringenina foi liberada de forma lenta e sustentada e de acordo com a sensibilidade do flavonoide ao pH. Nos estudos *in vivo*, utilizando a naringenina, nos quais ratos foram induzidos aos diabetes por estreptozotocina, observou-se uma diminuição da glicemia.

Malgarim et al. (2016) compararam nanocápsulas preparadas pela técnica de deposição interfacial de polímero pré-formado utilizando Eudragit L 100, monoestearato de sorbitano, etanol, adipato de diisopropila e água. A naringenina e a naringina foram adicionadas até concentrações de 2 mg/mL. Foram avaliadas as propriedades físico-químicas, o teor nas suspensões e a eficiência de encapsulação da naringina e da naringenina. As nanocápsulas foram submetidas a teste *in vivo* com a linhagem celular Vero. Devido às suas características lipofílicas e à baixa solubilidade em água, a naringenina apresentou menor taxa de liberação e indicou que teve afinidade pela matriz polimérica e pelas gotículas de óleo constituintes da formulação. Tais resultados denotam que diversos fatores podem afetar a liberação de fármacos como a degradação da matriz polimérica, massa molar, afinidade entre o ativo e o polímero e a estrutura química do composto.

A  $\beta$ -lactoglobulina, uma abundante proteína do soro do leite, foi avaliada para encapsulação da naringenina através de fortes ligações entre naringenina e a proteína (SHPIGELMAN et al., 2014). A formação de tais complexos permitiu a solubilização da naringenina e impediu a cristalização do flavonoide até três vezes o seu limite de solubilidade. Como a naringenina é absorvida no cólon após a desglicosilação da naringina por enzimas bacterianas, sugere-se que absorção da naringenina se inicie no começo do trato digestivo para isto é necessário pesquisas que avaliem a biodisponibilidade dessa absorção em nanocápsulas e propriedades sensoriais da naringenina quando solubilizada com  $\beta$ -lactoglobulina.

Outra alternativa para melhorar a estabilidade e dissolução da naringenina foi apresentada por GRATIERI et al. (2020) que por meio do procedimento de precipitação com mudança de solvente, obtiveram complexos de inclusão de ciclodextrina com naringenina, sugerindo o aumento da viabilidade industrial da utilização da naringenina.

### **3.3.Dispersão Sólida**



A dispersão sólida surgiu pela primeira vez em 1961 com a formação de uma mistura eutética proposta por Keiji Sekiguchi e Norobu Obi. Tal mistura composta por um fármaco (sulfatiazol) pouco solúvel e uma matriz altamente solúvel e cristalina (ureia) preparada por meio do processo de fusão da mistura física do medicamento e da matriz que logo sofreu uma rápida solidificação. Outros pesquisadores relataram a utilização da solução sólida na qual um medicamento fosse disperso molecularmente em meio solúvel e as vantagens da mistura eutética (CHIOU; RIEGELMANT, 1971) Nesse contexto, a técnica de dispersão sólida consiste na mistura de um polímero encapsulante e o composto bioativo a ser encapsulado (hidrofóbico) que são solubilizados em um solvente orgânico comum (etanol ou uma solução hidroalcoólica). Em seguida, são submetidos à sonicação, para indução da interação por ligação de hidrogênio entre o polímero e as moléculas a serem encapsuladas, finalizando com a evaporação de todos os solventes utilizados (HELENO et al., 2018).

O Poloxamer 407 é um dos copolímeros em bloco que contém aproximadamente 70% de unidade de polioxietileno e 30% de blocos de polioxipropileno. Em concentrações de 20% ou mais em solução aquosa o Poloxamer 407 apresenta propriedade de gelificação térmica reversível. Essas preparações transformam-se de soluções de baixa viscosidade em géis semi-sólidos após aquecimento de 4 °C até a temperatura corporal (37 °C). Essas propriedades tornam o Poloxamer 407 um veículo promissor para liberação controlada (WHITE; CALABRESE, 2022).

### **3.4. Sistema Colinérgico**

O sistema colinérgico é formado por uma extensa rede de neurônios de projeção denominados de neurônios colinérgicos que possuem mecanismos que sintetizam e liberam acetilcolina (Ach) (PEPEU; GRAZIA GIOVANNINI, 2017). O sistema colinérgico é responsável por regular vários aspectos da função cerebral, como processamento sensorial, atenção, sono, aprendizagem, memória e excitação, além de modular a atividade neural via receptores de Ach (LI et al., 2017). A Ach é o neurotransmissor mais abundante no corpo e o neurotransmissor primário no cérebro, responsável pela transmissão colinérgica (ANJANEYULU; DHARMA RAO; BAJAJ, 2021).

As enzimas colinesterases também compõem o sistema colinérgico e têm por função hidrolisar o neurotransmissor Ach em acetato e colina. Dentre as enzimas presentes no sistema nervoso central, há a família das colinesterases (ChEs) que são representadas pela

acetilcolinesterase (AChE, EC 3.1.1.7) e pela butirilcolinesterase (BChE, EC 3.1.1.18) (ARAÚJO et al., 2016). A AChE e a BChE são chamadas também de enzimas irmãs, sendo responsáveis pela hidrólise da Ach em colina e ácido acético (ORHAN et al., 2018). A AChE possui alta atividade catalítica e se localiza principalmente em junções neuromusculares e sinapses cerebrais colinérgicas, bem como eritrócitos (ARAÚJO et al., 2016). Ela possui um papel fundamental no funcionamento neural por meio das vias colinérgicas, além de finalizar os impulsos nervosos ao catalisar a hidrólise da Ach (ORHAN et al., 2018).

A enzima AChE desempenha um papel fundamental na hidrólise do neurotransmissor Ach e tende a se depositar dentro dos emaranhados neurofibrilares e placas amilóides relacionadas com a doença de Alzheimer (DA) (ANJANEYULU; DHARMA RAO; BAJAJ, 2021).

Inibidores das colinesterases podem ser utilizados como agentes farmacológicos de primeira linha para o tratamento de doenças (DA). Existem vários medicamentos aprovados baseados na inibição reversível das ChEs, como tacrina, rivastigmina, donepezil e galantamina. No entanto, o uso dos presentes inibidores das ChEs possui algumas limitações devido aos seus efeitos colaterais como náuseas, vômitos, diarreia, dor abdominal, anorexia (KHAN et al., 2018; LEMES et al., 2016; ORHAN et al., 2018).

A BChE, também conhecida como pseudocolinesterase, é expressa na glia e em áreas selecionadas do sistema nervoso central e periférico. Ela se diferencia da AChE por seu substrato butirilcolina (BCh) e sua sensibilidade à inibidores seletivos (MARINHO et al., 2019; ROCHE et al., 2009). A função principal da BChE é hidrolisar os vários ésteres de colina que são formados durante processos metabólicos, como a BCh que possui uma poderosa ação nicotínica e é o substrato ideal para a BChE (BECKETT; VAUGHAN; MITCHARD, 1968). A BChE é encontrada em maior parte no plasma sanguíneo sendo por este motivo conhecida também como colinesterase plasmática, e possui menor seletividade em relação a AChE hidrolisando tanto a Ach quanto a BCh (ARAÚJO et al., 2016).

A AChE e a BChE apresentam semelhanças em suas estruturas, sendo seus aminoácidos homólogos em aproximadamente 50%. A heterogenia é responsável em conferir seletividade tanto aos substratos quanto aos inibidores destas enzimas (ARAÚJO et al., 2016). Vários eventos celulares e moleculares participam na progressão de doenças neurodegenerativas, incluindo ativação de apoptose neuronal, comprometimento de funções mitocondriais, depósitos de proteínas agregadas, citotoxicidade e aumento de dano oxidativo (LIAQUAT et al., 2018). Estudos indicam que alguns flavonoides podem atuar na inibição reversível da

atividade da AChE, aumentando a concentração desse neurotransmissor colinérgico (KHAN et al., 2018). A descoberta de novos inibidores das enzimas AChE, a BChE que podem estar relacionadas com a DA tem por objetivo aumentar os níveis de Ach para melhorar a transmissão e cognição colinérgica, pois a inibição das principais enzimas colinesterases podem diminuir os sintomas da DA (MEHTA; ADEM; SABBAGH, 2012).

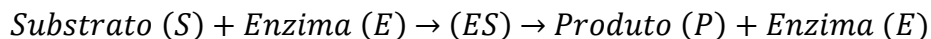
Estudos sobre a inibição da atividade da AChE e BChE decorrente da ação da naringenina revelam o potencial da naringenina para o tratamento de doenças do sistema nervoso (LEE et al., 2018; UMUKORO et al., 2018). Na literatura, há descrição da concentração que inibe 50% da atividade das ChEs ( $IC_{50}$ ), sendo que a naringenina apresentou uma faixa de inibição da AChE entre 28,2 a 1345  $\mu$ M (SARKAR; ULLAH; PROTTOY, 2020). Conforme Lee et al. (2018) a naringenina apresentou  $IC_{50}$  para a AChE igual a 42,66  $\mu$ M e para a BChE o valor foi maior que 100  $\mu$ M.

### 3.5 Atividade Enzimática

Nesse item estão compiladas informações sobre o modo de ação das enzimas e sobre como determinadas substâncias podem agir como inibidoras enzimáticas, pois elas são importantes para o entendimento da ação da naringenina como modulador enzimático. Salvo quando indicado, esse item foi embasado nas obras de Liberato; Oliveira (2019), Marzocco (2015) e Nelson; Cox (2014).

#### 3.5.1. Cinética Enzimática

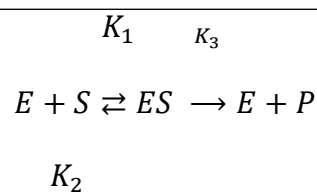
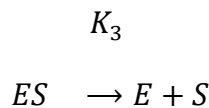
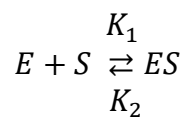
As enzimas são proteínas que possuem atividade catalisadora, ou seja, atuam aumentando a velocidade das reações químicas, que na ausência de uma catálise seriam extremamente lentas. A reação catalisada por enzima pode ser esquematizada da seguinte forma:



Muitas enzimas apresentam fendas com dimensões fixas que permitem a inserção somente de compostos com determinada configuração, ou seja, o substrato se ajusta a esses sítios de ligação como uma chave se ajusta a fechadura. Esse conceito é denominado de modelo chave-fechadura que foi proposto por Fisher em 1980. Outro modelo de ligação de enzima-substrato proposto por Koshland em 1958 mostra-se mais flexível pois define que os sítios ativos dessas enzimas não estão completamente pré-formados e que a interação enzima-substrato promove uma alteração conformacional da enzima que forma o sítio ativo de a estrutura correta para interagir com os grupos funcionais do substrato.

A estrutura tridimensional e a forma das enzimas podem ser afetadas por fatores que promovam a mudanças conformacionais das proteínas. Com isso, a atividade enzimática depende da concentração e especificidade da enzima, natureza do substrato e do meio como fatores de temperatura e do pH (KUROZAWA; PARK; HUBINGER, 2009). A eficiência da catálise depende do encontro da enzima com substrato com conformação e cargas adequadas que promovam a interação entre eles. Considerações em relação a pH e temperatura são pertinentes quando ocorrem principalmente estudos de atividade enzimática *in vitro*.

A reação catalítica ocorre em duas etapas: na primeira, a enzima (E) se liga ao substrato ou substratos e forma um complexo denominado enzima-substrato (ES). Na segunda fase o produto é liberado e a enzima volta a sua forma livre e pode então se ligar a outra molécula de substrato (CERONI; VANIN, 2021). Durante a cinética enzimática, partindo de uma reação em que há apenas um substrato (S) e um produto (P), tem-se que:



a formação do complexo enzima-substrato (ES), que acontece na primeira fase, ocorre em uma velocidade maior que a sua decomposição, segunda fase, e as equações de velocidades dessas fases são:

$$V_1 = K_1[E][S]$$

$$V_3 = K_3 [ES]$$

$$\text{com } K_1 > K_2 > K_3$$

Onde,

$K_1$  = constante da velocidade de formação do complexo ES;

$K_2$  = constante de velocidade de dissociação de ES em E+S;

$K_3$  = constante de velocidade da formação do produto.

Com isso, a velocidade da formação do produto é igual a  $V_3$  já que esta é a etapa mais lenta e limitante do processo. A atividade de uma enzima pode ser determinada de acordo com a velocidade de conversão do substrato em produto pela ação enzimática, podendo ser obtido pela variação da concentração do substrato ou por integração da equação de Michaelis-Menten que permite a determinação dos parâmetros catalíticos a partir de um ensaio (OLIVEIRA; SILVA, 2017) . A determinação pela equação de Michaelis-Menten se dá por ajuste não linear de modelos cinéticos aos dados de uma curva progressiva de formação do produto ou de decaimento do substrato ao longo do tempo. Ajustes não lineares possuem vantagens sobre o tratamento linear de dados de catálise enzimática, como por exemplo, os gráficos de Lineweaver-Burk.

### 3.5.2 Equações de Michaelis-Menten e de Lineweaver-Burk

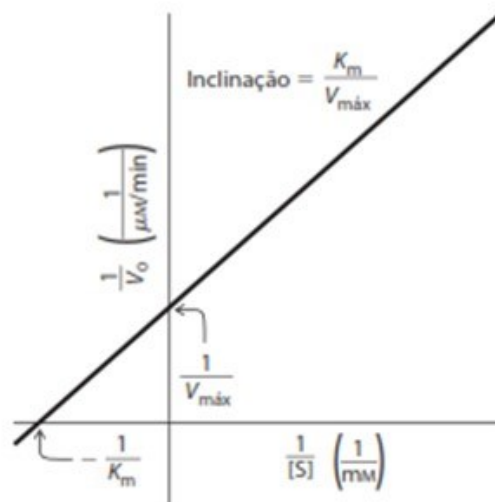
A equação de Michaelis-Menten (Equação 2) pode ser alterada algebricamente na forma da Equação e, conhecida como Equação de Lineweaver-Burk (Equação 3).

$$V_0 = \frac{V_{max} [S]}{K_m + [S]} \quad (2)$$

$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_m}{V_{max} [S]} + \frac{1}{V_{max}} \quad (3)$$

A utilização da equação de Lineweaver-Burk produz uma representação duplo-recíproca, que também é chamado de gráfico de Lineweaver-Burk (Figura 2) que tem por vantagens permitir uma determinação mais assertiva de  $V_{\text{máx}}$  obtida apenas aproximadamente nos gráficos mais simples de  $V_0$  versus  $[S]$ , além de auxiliar na diferenciação dos mecanismos de reação enzimática (NELSON; COX, 2014).

**Figura 2.** Gráfico de duplo-recíproco de Liweaver-Burk.



Fonte: NELSON; COX, (2014)

A determinação do tipo de inibidor ou inibição de uma reação enzimática pode partir da realização de dois conjuntos de experimentos. Nos primeiros experimentos deve-se manter a concentração do substrato  $[S]$  e altera-se a concentração do inibidor  $[I]$  permitindo medir o efeito do aumento da  $[I]$  sobre a velocidade inicial, já no segundo experimento mantém a  $[I]$  e a constante  $[S]$ . Os resultados são usados para construir um gráfico  $1/V_0$  versus  $1/[S]$ .

### 3.5.3. Inibidores Enzimáticos

As enzimas catalisam quase todos os processos celulares, porém existem moléculas que interferem na catálise e são chamados de inibidores enzimáticos. O estudo de inibidores enzimáticos fornece informação sobre os mecanismos enzimáticos e ajuda a desvendar algumas

vias metabólicas. Existem duas amplas classes de inibidores enzimáticos: reversíveis e irreversíveis, classificados segundo a estabilidade de sua ligação com a molécula.

Os inibidores irreversíveis reagem quimicamente com as enzimas inativando-as definitivamente e ocorre de forma progressiva, aumentando com o tempo até que se atinja a máxima inibição (MARQUES; YAMANAKA, 2008). Como exemplo, tem-se os compostos organofosforados, que formam ligações covalentes com o grupo hidroxila de resíduos do aminoácido serina ou de iodoacetamida reagindo com o grupo -SH de resíduos do aminoácido cisteína. Porém, estes inibidores se tornam tóxicos ao organismo pois podem inibir a ação de qualquer enzima já que se ligam a aminoácidos que comumente aparecem na estrutura das enzimas. Outro inibidor irreversível, porém, com baixa toxicidade, é a penicilina que inibe as enzimas da síntese da parede celular bacteriana, desestruturando a parede celular que fica sujeita à lise. Esta ação inibitória da penicilina torna-se ideal pois o agente terapêutico atua especificamente sobre uma enzima bacteriana.

A inibição reversível das enzimas é um processo caracterizado por taxas de ativação/desativação altas de modo que o equilíbrio entre enzima (E), inibidor (I) e enzima-inibidor (EI) se estabelece em segundos e pode ocorrer com dois tipos de inibidores, os competitivos e não competitivos (LUSHCHEKINA; MASSON, 2020).

Os inibidores competitivos são aqueles que competem com o substrato pelo sítio ativo da enzima, pois por apresentarem características semelhantes ao substrato, são capazes de se ligar a enzima formando um complexo EI que é semelhante ao complexo ES, porém não gera produto, decrescendo a atividade enzimática. Por se tratar de um processo reversível, a ligação deste tipo de inibidor ao mesmo sítio de ligação do substrato e a molécula da enzima é liberada, seja por dissociação do complexo EI ou ES está irá associar-se a moléculas de substrato ou inibidor e essa probabilidade depende das concentrações e das afinidades relativas entre a enzima e o substrato e a enzima e o inibidor. Neste caso, ocorre a alteração do valor de  $K_m$  que aparece maior do que o da reação normal. No entanto, este valor não pode ser utilizado como uma medida de  $K_m$  que deve ser realizada na ausência de inibidores. Assim o novo valor da constante medido na presença de inibidores é chamado de  $K_m$  *aparente* e este é comparado com o valor do  $K_m$  para determinação do tipo do inibidor.

Os inibidores competitivos são muito empregados por sua atividade terapêutica, por inibirem as reações que ocorrem especialmente em organismos parasita, vírus ou bactéria. Como exemplo dessa inibição temos a utilização do medicamento zidovudina (AZT) que atua

como inibidor da DNA polimerase (transcriptase reversa) que é necessária para a replicação do vírus HIV causador da AIDS.

Os inibidores não-competitivos não são semelhantes aos substratos, agem se ligando a radicais que não pertencem ao sítio ativo e alteram a estrutura da enzima inviabilizando a catálise. O ponto de ligação do inibidor não-competitivo (I<sub>NC</sub>) com a enzima são os grupos de cadeia laterais dos aminoácidos com o grupo OH de serina ou o grupo SH de cisteína. Como estes grupos de radicais são comuns nas enzimas o inibidor não-competitivo é inespecífico em relação a enzimas, podendo atuar em várias delas.

Mesmo sendo reversível a sua ligação à molécula da enzima, a ação do inibidor não-competitivo não é diminuída devido ao equilíbrio entre a enzima e o inibidor que durante o tempo em que determinada porcentagem de enzima está ligada ao inibidor ela se torna inativa, diminuindo sua ação sobre o substrato. A enzima que se liga ao inibidor não-competitivo pode encontrar-se livre e ativa no outro momento, já quando esta se liga a um inibidor irreversível ela se torna inativa permanentemente.

### **3.6. Enzimas oxidativas**

O oxigênio é um elemento fundamental para os organismos aeróbios. O oxigênio é responsável pela oxidação que causa alterações orgânicas e funcionais nas células. Em baixa concentração, os radicais livres não são nocivos para nosso organismo, mas conforme aumenta a concentração resulta em estresse oxidativo devido as altas concentrações de espécies reativas de oxigênio (EROS), sendo este um coadjuvante para a progressão de doenças degenerativas (IGHODARO; AKINLOYE, 2018; MORA AGÜERO; ZELEDÓN AGUILERA; VARGAS RUBIO, 2019; POETINI et al., 2018).

Dentre as enzimas reguladoras da concentração de EROS presentes destacam-se a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT) e as glutathione transferase (GST) (ARAÚJO et al., 2018).

A naringenina possui atividade antioxidante eficaz devido aos seus grupos OH que tem alta afinidade por EROS. Os efeitos antioxidantes da naringenina ocorrem tanto eliminando diretamente os radicais livres como aumentando o sistema antioxidante após a regulação da expressão celular de enzimas antioxidantes como a SOD, CAT, glutathione peroxidase (GPx) e glutathione transferase (GST) (LUTU et al., 2019).



A superóxido dismutase (SOD) (EC 1.15.1.1) é a primeira enzima de desintoxicação e antioxidante mais efetiva da célula pois atua como componente de primeira defesa contra as EROS. Está presente em organismos aeróbicos e é responsável por catalisar a dismutação de duas moléculas de ânion superóxido ( $\cdot\text{O}_2$ ) em peróxido de hidrogênio e oxigênio molecular ( $\text{O}_2$ ) tornando o ânion superóxido potencialmente menos tóxico. SOD é uma enzima que requer um cofator para sua atividade, e com base no tipo de íon metálico requerido ocorre a variação da forma da enzima. Os íons que normalmente se ligam a SOD são: ferro (Fe), zinco (Zn), cobre (Cu) e manganês (Mn). É encontrada em procariontes e cloroplastos, em mitocôndrias e citosol de eucariotos (IGHODARO; AKINLOYE, 2018; STEPHENIE et al., 2020).

A catalase (CAT) (EC 1.11.1.6) é uma enzima presente em organismos aeróbicos e anaeróbicos. Utiliza o ferro ou o manganês como cofator e catalisa a degradação ou redução do peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) em água e oxigênio molecular completando o processo de desintoxicação imitado pela SOD. A CAT está presente principalmente nos peroxissomos, mas ausentes em mitocôndrias de mamíferos, com exceção das mitocôndrias encontradas em coração de ratos (IGHODARO; AKINLOYE, 2018; SEPASI TEHRANI; MOOSAVI-MOVAHEDI, 2018).

### 3.7. *Drosophila melanogaster*

O uso de animais em experimentos, testes de fármacos e rastreios toxicológicos para desenvolvimento de novos tratamentos que possam beneficiar a sociedade vêm sendo questionado e debatido há anos, devido à dor, angústia e morte causada a estes animais (DOKE; DHAWALE, 2015). Organizações nacionais e internacionais têm incentivado pesquisas para que utilizem 3Rs (do inglês reduzir, refinar e substituir) como estratégia para diminuir o uso modelos de mamíferos em experimentos e utilizem metodologias complementares e alternativas e o uso de modelos não mamíferos (ADEDARA et al., 2022; JONG, 2019; DOKE; DHAWALE, 2015).

*As Drosophila melanogaster* ou moscas-da-fruta tem sido amplamente utilizada como organismo modelo em pesquisas de genética e alimentos e para avaliação de toxicidade ou efeitos benéficos de vários produtos químicos e de derivados de plantas. Elas apresentam ciclo de vida relativamente curto (60 a 80 dias), o que a torna atraente para estudos de expectativa de vida. Além disso, aproximadamente 60% dos genes da mosca da fruta são ortólogos ou homólogos para mamíferos (KLIMACZEWSKI et al., 2018; LI et al., 2020; STAATS et al., 2018).

As *Drosophila melanogaster* apresentam vantagens em estudos que envolvem distúrbios cerebrais devido à semelhança de seus genes com genes humanos, principalmente para funções cognitivas. Em razão de *D. melanogaster* apresentarem comportamentos complexos relevantes para os seres humanos como por exemplo, aprendizagem e memória (ARAUJO et al., 2015; POETINI et al., 2018). As colinesterases encontradas em *D. melanogaster* estão presentes principalmente no sistema nervoso central e possuem homologias as encontradas em seres humanos (FOURNIER et al., 1989). Estudos utilizam homogeneizados de *D. melanogaster* para a verificação de atividade da acetilcolinesterase (ARAUJO et al., 2015; KLIMACZEWSKI et al., 2018; POETINI et al., 2018)

Estudos com com dispersões sólidas contendo óleo de cravo apresentaram resultados que indicam que essas formulações apresentam bom potencial quando analisados sobre a atividade biológica em DM (DE MENESES et al., 2019).

A avaliação de nanopartículas carregadas de luteína apresentou bons resultados ao analisar a luteína frente as enzimas colinérgicas e demais indicadores de estresse oxidativo, promovendo evidências destas nanopartículas como tratamento alternativo para danos que envolvem o sistema colinérgico (GRELLA MIRANDA et al., 2020).

#### **4.1. Material**

A naringenina e o Poloxamer 407 foram adquiridos da empresa Sigma-Aldrich. Para análises de Espectroscopia de Infravermelho utilizou-se brometo de potássio (grau espectroscópico, Sigma-Aldrich). Para as análises da atividade sobre as enzimas acetilcolinesterase (AChE, E.C. 3.1.1.7 de *Electrophorus electricus* (enguia), Sigma-Aldrich Sigma C3389-500UN) e butirilcolinesterase (BChE, E.C. 3.1.1.8 de soro equino, Sigma-Aldrich C7512-1.2KU) foram utilizados Tris (hydroxymethyl) aminomethane hidrocloreto (Tris-HCl), 5,5-ditio-bis- (ácido 2-nitrobenzóico) DTNB; 98%, Sigma-Aldrich), iodeto de acetiltiocolina (ASCh; 99%, Sigma-Aldrich A5751) e iodeto de butiriltiocolina (BSCh; 99%, Sigma-Aldrich 20820) e tampão fosfato de potássio (TFK; pH 7.5, Neon).

#### **4.2. Atividade e cinética enzimática *in vitro* da acetilcolinesterase (AChE)**

A atividade da AChE foi determinada de acordo com o método de Ellman (1959) com modificações. Em placa de 96 poços foram adicionados: 90  $\mu\text{L}$  de tampão Tris-HCl 0,5 M (pH 7,5), 45  $\mu\text{L}$  de água ultrapura e 15  $\mu\text{L}$  da enzima AChE (0,09 U/mL). Além disso, adicionou-se 10  $\mu\text{L}$  diferentes concentrações de naringenina (20, 40, 80 e 160  $\mu\text{M}$ ). No grupo controle (CT) foi adicionado água ultrapura. Após incubação por 10 minutos a 25°C, adicionou-se 20  $\mu\text{L}$  de 5,5'-Dithiobis (ácido 2-nitrobenzóico) (DTNB) 2 mM. Em seguida, foram acrescentados 20  $\mu\text{L}$  de iodeto de acetiltiocolina (ASCh; 800  $\mu\text{M}$ ). A quantificação da absorbância foi realizada em 405 nm a cada 1 minuto durante 4 minutos por meio do espectrofotômetro de microplaca (Thermoplate TP-Reader). A atividade da AChE foi calculada com base na concentração capaz de inibir 50% da atividade da AChE ( $\text{IC}_{50}$ ) em relação ao controle (CT) utilizando regressão não-linear.

A avaliação da cinética enzimática foi realizada de acordo com modificações no método proposto por Miranda et al. (2020). Foram seguidos os mesmos passos descritos acima, com acréscimo de variações na concentração do substrato, ou seja, foram avaliadas diferentes concentrações de iodeto de acetiltiocolina (ASCh; 25, 50, 100, 400 e 800  $\mu\text{M}$ ). A constante de inibição do complexo enzima-substrato-inibidor ( $K_i$ ) foi obtida por meio da análise do gráfico de Lineweaver-Burk utilizando o software Prism 5 (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA, 2007).

### **4.3. Atividade e cinética enzimática *in vitro* da butirilcolinesterase (BChE)**

A atividade da BChE foi determinada de acordo com o método de Ellman (1959) com modificações. Em placa de 96 poços foram adicionados 90  $\mu\text{L}$  de tampão Tris-HCl 0,5 M (pH 7,5), 45  $\mu\text{L}$  de água ultrapura e 15  $\mu\text{L}$  da enzima BChE (1,25 U/mL). Além disso, também adicionou 10  $\mu\text{L}$  diferentes concentrações de naringenina (40, 80, 160, 320 e 640  $\mu\text{M}$ ). No grupo controle (CT) foi adicionado água ultrapura. Após incubação por 10 minutos a 25°C, adicionou-se 20  $\mu\text{L}$  de 5,5'-dithiobis (ácido 2-nitrobenzóico) (DTNB) 2 mM. Em seguida, foram acrescentados 20  $\mu\text{L}$  de iodeto de butiriltiocolina (BSCh; 800  $\mu\text{M}$ ). A quantificação da absorbância foi realizada em 405 nm a cada 1 minuto durante 4 minutos por meio do espectrofotômetro de microplaca (Thermoplate TP-Reader). A atividade da BChE foi calculada com base na concentração capaz de inibir 50% da atividade da BChE ( $\text{IC}_{50}$ ) em relação ao controle (CT) utilizando regressão não-linear.

A avaliação da cinética enzimática foi realizada de acordo com modificações no método utilizado por Miranda et al. (2020). Foram seguidos os mesmos passos descritos acima, com acréscimo de variações na concentração do substrato, ou seja, foram avaliadas diferentes concentrações de iodeto de butiriltiocolina (BSCh; 25, 50, 100, 400 e 800  $\mu\text{M}$ ). A constante de inibição do complexo enzima-substrato-inibidor ( $K_i$ ) foi obtida por meio da análise do gráfico de Lineweaver-Burk utilizando o software Prism 5 (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA, 2007).

#### **4.4. Obtenção e caracterização da dispersão sólida contendo naringenina**

A dispersão sólida contendo a naringenina foi obtida pela técnica de dispersão sólida descrita previamente por Almeida et al (2018b) e Serajuddin (1999), com pequenas modificações. Poloxamer 407 (0,9 g) e Tween 80 (0,009 g) foram adicionados ao etanol (37,5 mL) sob agitação branda a 60°C por 5 minutos. Logo após, foi adicionada a naringenina (0,090 g) e agitada por mais 5 minutos e, em seguida, submetida à sonicação (Fisher Scientific, 120 W, ponteira de 1/8" de diâmetro) por 3 minutos (pulsos de 30 segundos e 10 segundos de pausa) em banho de gelo. O etanol foi então evaporado em estufa com circulação e renovação de ar a 40°C por aproximadamente 24 horas. As amostras secas foram armazenadas refrigeradas a 10°C ao abrigo de luz.

Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC, Perkin Elmer 4000) foi utilizada para avaliar o estado físico da naringenina e da dispersão sólida. Cerca de 5 a 10 mg do analito foram alocadas em porta-amostras de alumínio fechadas e aquecidas de 0 a 400°C com taxa de 20°C.min<sup>-1</sup> e fluxo de nitrogênio de 50 mL.min<sup>-1</sup>.

A existência de possíveis interações químicas entre os reagentes utilizados no processo da obtenção da dispersão sólida foi analisada por Espectroscopia no Infravermelho por Transformação de Fourier (FTIR, Shimadzu, modelo IR Affinity-1). Utilizou-se cerca de 1 mg de composto para produção de pastilhas de brometo de potássio (100 mg) que posteriormente foram analisadas com resolução de 2 cm<sup>-1</sup> entre 4750 e 450 cm<sup>-1</sup> e 32 *scans* cumulativos.

#### **4.5. Experimentos *in vivo***

#### 4.5.1. Manutenção de *Drosophila melanogaster*

Foram utilizadas *Drosophila melanogaster* (linhagem Harwich) adultas e de ambos os gêneros, que foram mantidas em frascos de vidro sob condições controladas de luz (ciclo claro/escuro de 12 horas), temperatura ( $24 \pm 1^\circ\text{C}$ ) e umidade (45 %). Foram alimentadas com meio padrão contendo 78,72% de água e 21,0% de mistura composta por 96,2% de farinha de milho, 2% de sacarose, 1,6% de leite em pó, 0,2% de cloreto de sódio (NaCl), 0,05% metilparabeno, 0,23% álcool etílico, 0,05% metilparabeno e fermento biológico preparados de acordo com protocolo estabelecido do laboratório.

#### 4.5.2. Taxa de sobrevivência

Foram utilizadas moscas jovens (2-3 dias), sendo a primeira etapa a sincronização do tempo de vida das moscas. Neste procedimento, os vidros contendo meio padrão em boas condições de sobrevivência e com maior número de larvas foram separados e todas as moscas vivas contidas no vidro serão removidas, sobrando apenas as larvas. Após a eclosão das larvas (2-3 dias), as moscas foram mantidas nos vidros por um período de 2 dias até tornarem-se adultas. No terceiro dia após a eclosão, as moscas foram adormecidas sob refrigeração por 30 segundos e 100 moscas (ambos os sexos) e transferidas para meio de análise (1% de ágar; 1% de levedura; 0,05% de sacarose; 1% de leite em pó; 0,08% de metilparabeno). Além disso, adicionou-se no meio de controle diferentes concentrações de naringenina (160, 210 e 250  $\mu\text{g/mL}$ ) ou da dispersão sólida contendo naringenina (160, 210 e 250  $\mu\text{g/mL}$ ). As concentrações para o teste de sobrevivência foram utilizadas em  $\mu\text{g/mL}$  para facilitar a diluição e cálculo e são superiores as utilizadas nos testes em vitro se comparadas a unidade de concentração em  $\mu\text{M}$  a saber temos para a 160  $\mu\text{g/mL}$  a concentração de 587,7  $\mu\text{M}$ ; a concentração de 210  $\mu\text{g/mL}$  de 771.35  $\mu\text{M}$  e a concentração de 250  $\mu\text{g/mL}$  de 918.3  $\mu\text{M}$ . O grupo controle não recebeu a suplementação de naringenina ou nanopartículas. A taxa de sobrevivência foi avaliada pela contagem diária do número de moscas vivas até o final do período experimental (5 dias) após a exposição a estas diferentes concentrações. Após as análises diárias da taxa de sobrevivência foi preparado homogeneizados de DM sendo separados em microtubos de centrifugação e congelados para posteriores análises. Cada frasco avaliado foi armazenado em microtubos de centrifugação específicos.

## 4.6. Experimentos *ex vivo*

### 4.6.1 Obtenção do homogeneizado de *Drosophila melanogaster*

O homogeneizado de moscas da espécie *D. melanogaster* (S1) foi preparado a partir da maceração manual de 80 moscas em 800  $\mu$ L de solução Tris-HCl 50 mM pH 7,0, respeitando a proporção de 1 mosca:10  $\mu$ L de solução. Em seguida, o homogeneizado foi centrifugado a 10.000 rpm durante 10 minutos e, o sobrenadante foi armazenado a -20 °C.

### 4.6.2. Atividade da acetilcolinesterase (AChE) presente no homogeneizado de *D. melanogaster*

A atividade da AChE das *D. melanogaster* foi determinada espectrofotometricamente através do método modificado de Ellman (1959), com algumas adaptações. O meio da reação composto por tampão TFK 100 mM (pH 7,5), 5,5'-Dithiobis (ácido 2-nitrobenzóico) (DTNB) 2 mM e a solução de sobrenadante (S1). Adicionou-se o substrato ASCh 800  $\mu$ M ao meio contendo o S1. A análise foi realizada em moscas suplementadas com diferentes concentrações de naringenina (160, 210 e 250  $\mu$ g/mL) ou da dispersão sólida contendo naringenina (160, 210 e 250  $\mu$ g/mL), além do grupo controle. A atividade da AChE foi medida através do aumento da absorbância em leitor de placa (Thermoplate TP-Reader) em comprimento de onda de 405 nm, com leituras a cada minuto durante 4 minutos. A atividade dos grupos tratados foi expressa em relação a porcentagem (%) do grupo controle.

### 4.6.3. Atividade da butirilcolinesterase (BChE) presente no homogeneizado de *D. melanogaster*

A atividade da BChE das *D. melanogaster* foi determinada espectrofotometricamente através do método modificado de Ellman (1959), com algumas adaptações. O meio da reação foi composto por tampão TFK 100 mM (pH 7,5), 5,5'-Dithiobis (ácido 2-nitrobenzóico) (DTNB) 2 mM e a solução de sobrenadante (S1). Adicionou-se o substrato BSCh 800  $\mu$ M ao meio contendo o S1. A análise foi realizada em moscas suplementadas com diferentes concentrações de naringenina (160, 210 e 250  $\mu$ g/mL) ou da dispersão sólida contendo

naringenina (160, 210 e 250 µg/mL), além do grupo controle. A atividade da BChE foi medida através do aumento da absorbância em leitor de placa (Thermoplate TP-Reader) em comprimento de onda de 405 nm, com leituras a cada minuto durante 4 minutos. A atividade dos grupos tratados foi expressa em relação a porcentagem (%) do grupo controle.

#### 4.6.4. Atividade inibitória da catalase (CAT) de homogeneizados de *Drosophila melanogaster*

O método utilizado para determinação da atividade enzimática da catalase foi descrito por (AEBI, 1984). A leitura foi feita no equipamento de UV-Vis (OceanOptics, Red Tide USB 650 UV). As amostras homogeneizadas foram descongeladas para a realização das análises. Em tubos de ensaio foram adicionados o tampão TFK 50 mM pH 7,0 (1800 µL) e a amostra homogeneizada (20 µL). O equipamento foi zerado e a leitura das amostras ocorreram em 240 nm em cubeta de quartzo. A primeira leitura foi apenas de solução tampão e amostra homogeneizada proveniente do tubo de ensaio, uma segunda leitura foi realizada imediatamente após a adição de peróxido de hidrogênio 30% (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (180 µL), diretamente na cubeta de quartzo e a terceira leitura foi feita após a ação de 3 minutos da substância.

O procedimento descrito acima foi realizado em duplicata para cada uma das amostras homogeneizadas. O resultado foi expresso em peróxido de hidrogênio consumido/ min.

A solução utilizada de peróxido de hidrogênio 30% é resultado da adição de TFK 50 mM pH 7,0 (5 mL) com peróxido de hidrogênio (170 µL), a preparação desta solução foi realizada no dia da análise e armazenada em frasco âmbar.

As amostras utilizadas foram provenientes dos homogeneizados de *Drosophila melanogaster* sendo 25 amostras dos homogeneizados de naringenina livre e 20 amostras dos homogeneizados de nanopartículas contendo naringenina

#### 4.6.5. Atividade inibitória da superóxido dismutase (SOD) de homogeneizados de *Drosophila melanogaster*

A atividade da superóxido dismutase é determinada pelo monitoramento da auto-oxidação da quercetina (decréscimo da absorbância) (AFANAS et al., 1989). A leitura das amostras ocorreu na leitora automática de microplacas (marca Thermoplate). Para a análise de cada uma das amostras homogeneizadas, foram adicionados TFK 100 mM pH 7,5 (50 µL), água destilada (30 µL), TEMED (40 µL), amostra homogeneizada/tecido (20 µL) e por último foram

adicionados NaOH (20  $\mu$ L) e a quercetina (20  $\mu$ L), respectivamente. A reação começa com a adição da quercetina, a leitura ocorreu em 405 nm no momento da adição (tempo zero), após 10 minutos e por fim, após 20 minutos.

Foi realizada uma leitura “em branco”, sem a presença da amostra homogeneizada (tecido). TFK 100 mM pH 7,5 (50  $\mu$ L), água destilada (50  $\mu$ L), TEMED (40  $\mu$ L) e por último foram adicionados NaOH (20  $\mu$ L) e a quercetina (20  $\mu$ L), respectivamente. A leitura ocorreu da mesma maneira das outras amostras e no mesmo comprimento de onda (405 nm).

O resultado foi expresso em quantidade de enzima requerida para inibir 50% da auto-oxidação da quercetina. As amostras utilizadas foram provenientes dos homogeneizados de DM sendo 25 amostras dos homogeneizados de naringenina livre e 20 amostras dos homogeneizados de nanopartículas contendo naringenina.

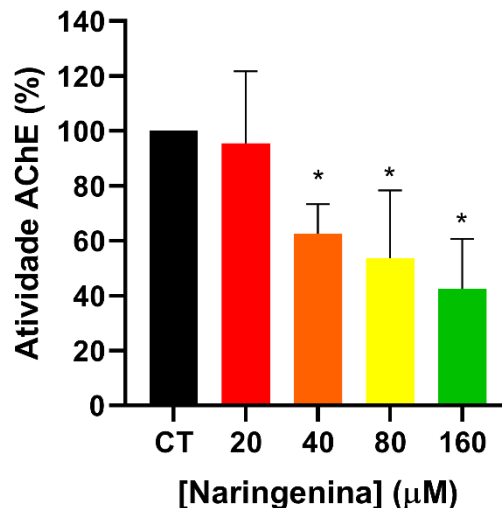


## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Atividade e cinética da enzima AChE sob ação da naringenina

A Figura 3 apresenta atividade enzimática realizada *in vitro* com a naringenina e a enzima acetilcolinesterase (AChE). O substrato utilizado foi iodeto de acetiltiocolina (ASCh; 800  $\mu$ M). A AChE foi incubada com diferentes concentrações de naringenina (20, 40, 80 e 160  $\mu$ M). O controle (CT) foi incubado com água ultrapura. Diferença significativa entre o grupo controle e o tratamento com naringenina foi determinada por análise de variância unidirecional (ANOVA) seguida pelo pós-teste de Tukey.

**Figura 3. Atividade enzimática *in vitro* da naringenina frente à enzima acetilcolinesterase (AChE)**  
**O substrato utilizado foi iodeto de acetiltiocolina (ASCh; 800  $\mu$ M). A AChE foi incubada com diferentes concentrações de naringenina (40, 80, 160, 320 e 640  $\mu$ M). O controle (CT) foi incubado com água ultrapura. Diferença significativa entre o grupo controle e o tratamento com naringenina foi determinada por análise de variância unidirecional (ANOVA) seguida pelo pós-teste de Tukey. \*  $p < 0,05$  em comparação ao grupo controle**



Fonte: Próprio Autor (2022)

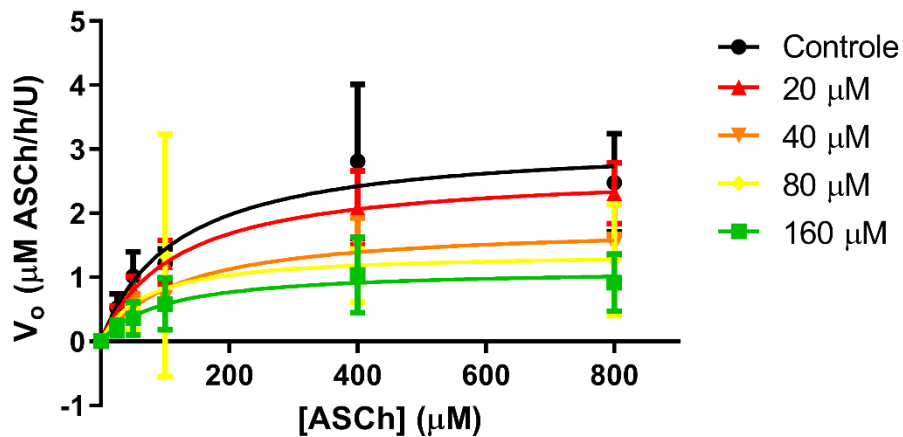
A naringenina foi capaz de inibir de forma dose-dependente a atividade da enzima AChE, sendo a concentração de naringenina responsável por inibir 50% da atividade da AChE ( $IC_{50}$ ) igual a  $99,4 \pm 59,25 \mu$ M. Na literatura, a faixa de inibição da enzima AChE pela naringenina varia entre 28,2 e 1345  $\mu$ M (SARKAR; ULLAH; PROTTOY, 2020). Resultados semelhantes

também foram encontrados por UMUKORO et al. (2018) e por ORHAN et al. (2018) que apresentam resultados de  $IC_{50} > 100 \mu\text{M}$  e de  $86,58 \pm 3,74 \mu\text{M}$  de concentração de naringenina.

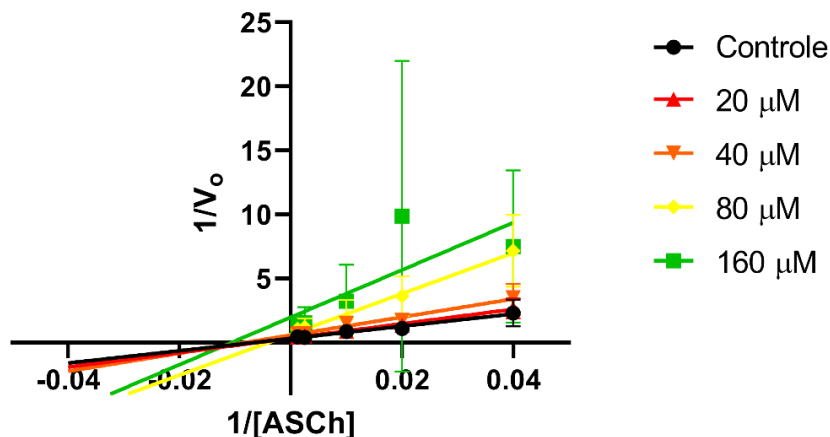
A Figura 4 apresenta os gráficos da avaliação da cinética enzimática para a acetilcolinesterase (AChE) e a naringenina.

Figura 4. Cinética enzimática *in vitro* da naringenina frente à enzima acetilcolinesterase (AChE).

Diferentes concentrações do substrato iodeto de acetiltiocolina foram utilizadas (ASCh; 25, 50, 100, 400 e 800  $\mu\text{M}$ ). A AChE foi incubada com diferentes concentrações de naringenina (20, 40, 80 e 160  $\mu\text{M}$ ). O controle (CT) foi incubado com água ultrapura. (a) Gráfico de Michaelis-Menten. (b) Gráfico de Lineweaver-Burk. Os dados representam a média  $\pm$  DP de pelo menos três experimentos independentes realizados em duplicata



(a) Gráfico de Michaelis-Menten para demonstração da cinética enzimática da AChE com as diferentes concentrações de substrato acetiltiocolina (ASCh) e naringenina



(b) Gráfico de Lineweaver-Burk para demonstração da inibição não-competitiva da naringenina frente a AChE

Fonte: Próprio Autor (2022)

A cinética enzimática da AChE foi realizada por meio da incubação da naringenina com diferentes concentrações de ASCh (0 a 800  $\mu\text{M}$ ). O gráfico de Michaelis-Menten (Figura 4<sup>a</sup>) demonstrou que o aumento na concentração de naringenina reduziu a velocidade ( $V_o$ ) da reação enzimática, indicando que a naringenina foi capaz de inibir a enzima AChE na presença de quantidades crescentes do substrato ASCh.

O mecanismo de inibição da enzima AChE foi determinado por meio do gráfico de Lineweaver-Burk (Figura 4b). O tipo de inibição enzimática é determinado pela posição em que as linhas do gráfico de Lineweaver-Burk se cruzam. Portanto, a inibição enzimática da naringenina sobre a enzima AChE pode ser considerada do tipo não-competitiva, pois a interseção ocorreu sobre o eixo  $x$  do gráfico e a constante de inibição do complexo enzima-substrato-inibidor ( $K_i$ ) da naringenina foi igual a 79,25  $\mu\text{M}$ . Resultado semelhante foi apresentado em estudos desenvolvidos por SARRIA et al. (2016) e WU et al. (2021).

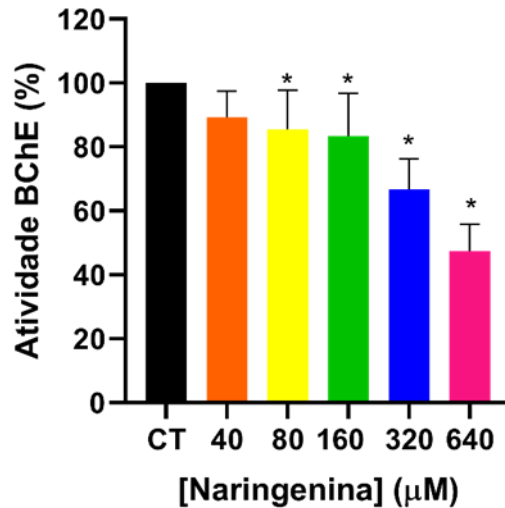
## **5.2. Atividade e cinética da enzima BChE sob ação da naringenina**

A Figura 5 apresenta a inibição da atividade enzimática da naringenina frente a enzima butirilcolinesterase (BChE). Na Figura 6 encontram-se os gráficos da avaliação da cinética enzimática.

A constante de inibição foi calculada com base na concentração capaz de inibir 50% da atividade da BChE ( $\text{IC}_{50}$ ) em relação ao controle, sendo igual a  $627,6 \pm 120,1 \mu\text{M}$ . Conforme descrito na literatura, a naringenina inibe a enzima BChE em concentrações superiores a 100  $\mu\text{M}$  (LEE et al., 2018).

Figura 5. Atividade enzimática *in vitro* da naringenina frente à enzima butirilcolinesterase (BChE)

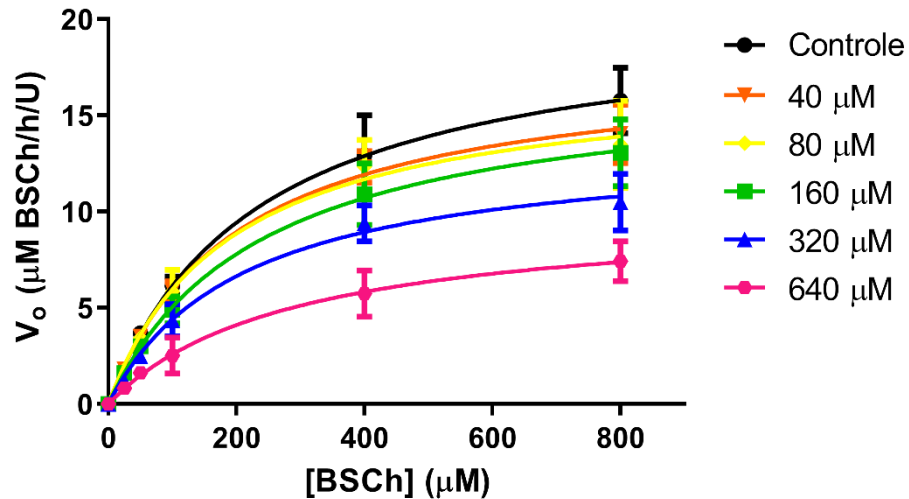
O substrato utilizado foi iodeto de butiriltiocolina (BSCh; 800  $\mu\text{M}$ ). A BChE foi incubada com diferentes concentrações de naringenina (40, 80, 160, 320 e 640  $\mu\text{M}$ ). O controle (CT) foi incubado com água ultrapura. Diferença significativa entre o grupo controle e o tratamento com naringenina foi determinada por análise de variância unidirecional (ANOVA) seguida pelo pós-teste de Tukey. \*  $p < 0,05$  em comparação ao grupo controle



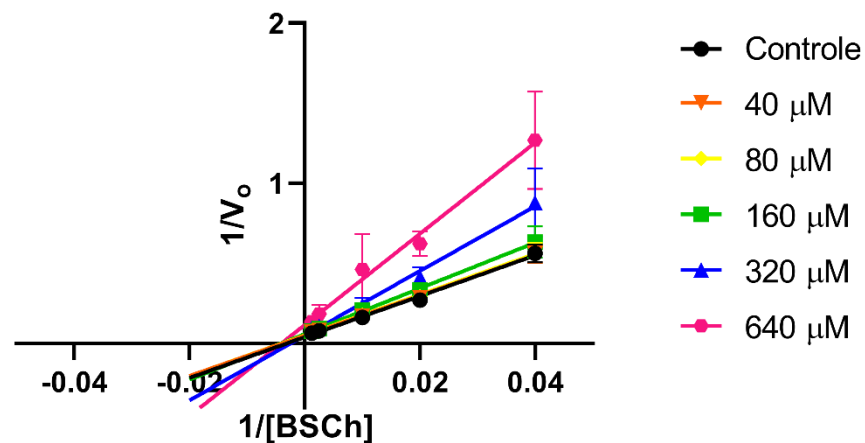
Fonte: Próprio Autor (2022)

O gráfico de Michaelis-Menten (Figura 6a) demonstrou que houve redução na velocidade ( $V_o$ ) da reação enzimática conforme a concentração de naringenina foi aumentada. A análise da interseção das retas no gráfico de Lineweaver-Burk (Figura 6b) permitiu concluir que a inibição enzimática da naringenina sobre a enzima BChE também é do tipo não-competitiva. Em seu estudo com naringenina e derivados WU et al. (2021) encontrou atividade de inibição não-competitiva para a enzima BChE. Além disso, a constante de inibição ( $K_i$ ) da naringenina foi igual a 624,3  $\mu\text{M}$ .

Figura 6. Cinética enzimática *in vitro* da naringenina frente à enzima butirilcolinesterase (BChE). Diferentes concentrações do substrato iodeto de butirilticolina foram utilizadas (BSCh; 25, 50, 100, 400 e 800  $\mu\text{M}$ ). A BChE foi incubada com diferentes concentrações de naringenina (40, 80, 160, 320 e 640  $\mu\text{M}$ ). O controle (CT) foi incubado com água ultrapura. Os dados representam a média  $\pm$  DP de pelo menos três experimentos independentes realizados em duplicata



(a) Gráfico de Michaelis-Menten para demonstração da cinética enzimática da BChE frente as diferentes concentrações de naringenina



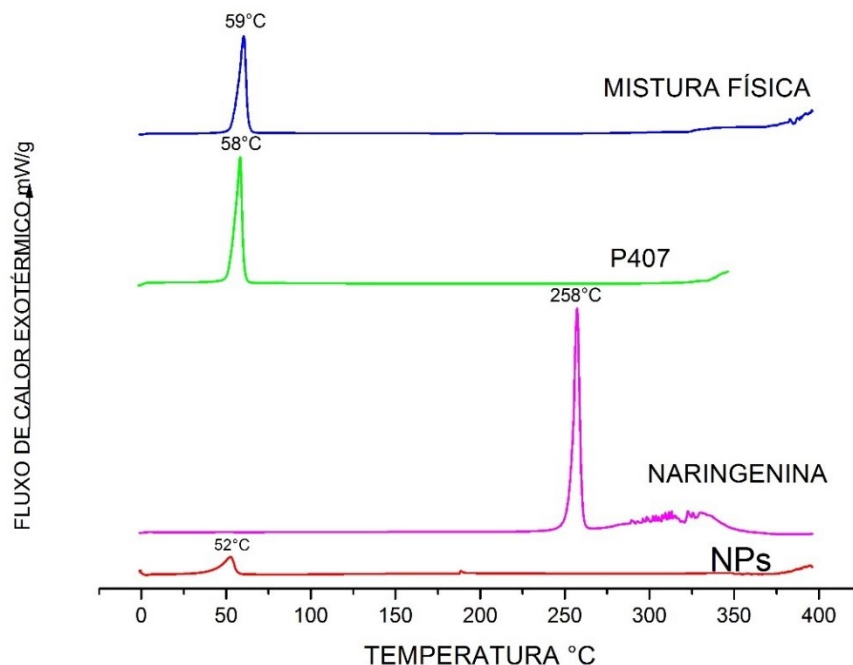
(b) Gráfico de Lineweaver-Burk para demonstração da inibição não-competitiva apresentada pela naringenina frente a enzima BChE

Fonte: Próprio Autor (2022)

### 5.3. Caracterização das nanopartículas contendo naringenina

Após a realização dos ensaios *in vitro* visando a verificar a atividade da naringenina livre, foi realizada a obtenção de dispersões sólidas contendo naringenina para avaliação destas frente as enzimas colinesterases. A Figura 7 apresenta o termograma de Calorimetria de Varredura (DSC) para as dispersões sólidas, incluindo a mistura física (MF) produzida na mesma proporção de encapsulante e naringenina encontrada nas partículas.

**Figura 7. Termogramas de DSC da naringenina, mistura física, Poloxamer 407 ( P407), nanopartículas contendo naringenina (NPs)**

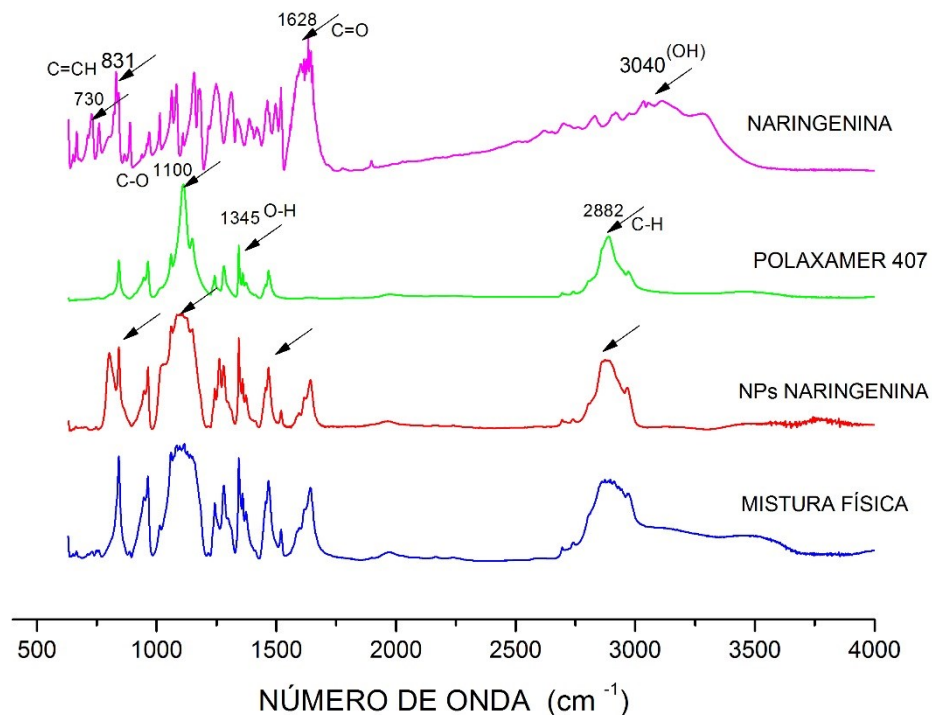


**Fonte: Próprio Autor (2022)**

Nos termogramas apresentados dos compostos puros é possível identificar os picos de fusão do P407 em 58°C, enquanto a naringenina apresentou um pico de fusão em 258°C (CUI et al., 2019; GUAN et al., 2020; SZAFRANIEC et al., 2018). O pico de temperatura de fusão da naringenina não foi detectado na dispersão sólida contendo naringenina, além de haver deslocamento do pico de fusão do P407, sugerindo que a naringenina está efetivamente encapsulada (SILVA-BUZANELLO et al., 2016; SZAFRANIEC et al., 2018).

A Figura 7 apresenta os espectros de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) da naringenina, Poloxamer 407 (P407), da dispersão sólida e da mistura física (obtida com naringenina e P407).

**Figura 8. Espectros de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) da naringenina, Poloxamer 407 (P407), das nanopartículas contendo naringenina e da mistura física**



Fonte: Próprio Autor (2022)

No espectro apresentado da naringenina pode-se notar bandas características da naringenina em  $3040 \text{ cm}^{-1}$  (OH),  $1628 \text{ cm}^{-1}$  (C=O) e  $831\text{-}730 \text{ cm}^{-1}$  (C=CH) de acordo com os encontrados em literatura (AMIN et al., 2020; CUI et al., 2019; YANG et al., 2020) e no espectro apresentado do P407 puro observou-se bandas características em  $2882 \text{ cm}^{-1}$  (C-H),  $1345 \text{ cm}^{-1}$  (O-H) e  $1100 \text{ cm}^{-1}$  (C-O) (KHAN; AKHTAR; MINHAS, 2020).

O espectro de FTIR da dispersão sólida contendo naringenina apresentou picos com intensidades menores em comparação a mistura física sugerindo interação entre os compostos, também é possível observar que os picos característicos da naringenina não estão bem

definidos, também sugerindo a encapsulação da naringenina (CUI et al., 2019; GUAN et al., 2020; LEMES et al., 2017; SILVA DE SÁ et al., 2019).

#### 5.4. Taxa de sobrevivência de *Drosophila melanogaster* (DM)

O efeito da dieta suplementada com naringenina livre e nanopartículas contendo naringenina, foi determinado pela taxa de sobrevivência de DM conforme apresentado na Figura 9.

Figura 9a. Efeito da dieta suplementada com naringenina livre na taxa de sobrevivência de *D. melanogaster*

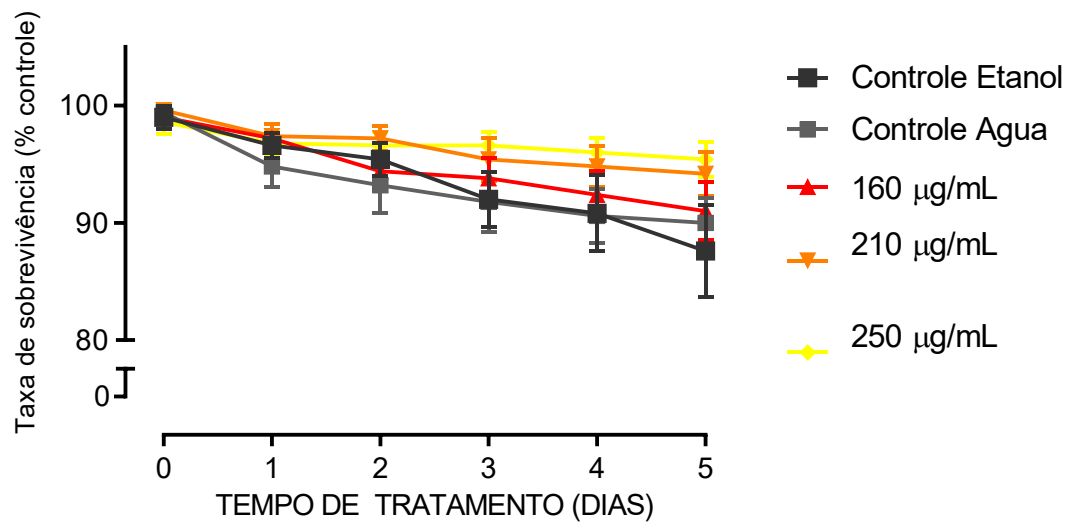
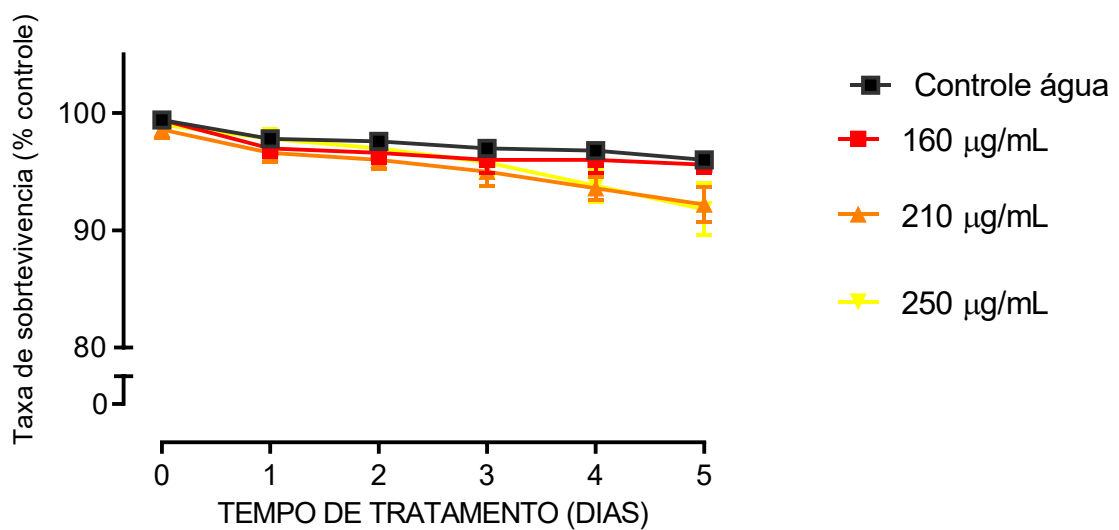


Figura 9b. Efeito da dieta suplementada com dispersão sólida contendo naringenina na taxa de sobrevivência de *D. melanogaster*



Fonte: Próprio Autor (2022)



As DM mantidas em dieta suplementada contendo naringenina ou a dispersão sólida contendo naringenina, como esperado, não apresentaram alterações significativas na taxa de sobrevivência em nenhuma das concentrações quando comparadas aos seus respectivos controles. Também foi observado que tanto o controle e os tratamentos não apresentaram interrupção do ciclo de vida das moscas pois em todos os frascos foram encontradas larvas em estágios iniciais, demonstrando que atividade biológica se manteve.

Um estudo apresentado com a utilização de ratos e nanopartículas contendo uma concentração de 50 mg/Kg de naringenina também não encontraram toxicidade ao uso de naringenina (MAITY et al., 2017). Porém estudos com embriões de anfíbios que utilizaram uma concentração de naringenina de 10 mg/L indicam que ocorreram alterações na formação embrionária (PÉREZ-COLL; HERKOVITS, 2004).

A atividade da naringenina inserida em nanopartículas ainda é pouco conhecida, porém diante dos resultados encontrados na literatura a naringenina encapsulada apresenta menor toxicidade que sua forma livre (CHAURASIA et al., 2018). Neste estudo pode se observar que o processo da encapsulação da naringenina não alterou a bioatividade da naringenina, embora tenha melhorado sua solubilidade em água.

### 5.5. Atividade da acetilcolinesterase e butirilcolinesterase em homogeneizados de *Drosophila melanogaster*

A Figura 10 apresenta os resultados obtidos das análises *ex vivo* dos homogeneizados avaliados pelo método de ELLMAN, (1959), utilizando a Ach como substrato. A Figura 11 apresenta os resultados obtidos das análises *ex vivo* dos homogeneizados utilizando a BSCh como substrato.

Figura 10. Efeito da naringenina e da dispersão sólida contendo naringenina sobre a atividade da enzima AchE *ex vivo* do tecido de *D. melanogaster*

Para avaliar a atividade da AchE foi utilizado homogeneizados de *D. melanogaster* tratados com diferentes concentrações (160, 210 e 250  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) de naringenina livre diluída em etanol (destaque em verde no gráfico) ou de nanopartículas contendo naringenina diluídas em água (destaque em azul no gráfico). O controle (CT) foi incubado com etanol ou água de acordo com a suplementação utilizada. Diferença significativa entre o grupo controle e o tratamento com naringenina foi determinada por análise de variância unidirecional (ANOVA) seguida pelo pós-teste de Tukey

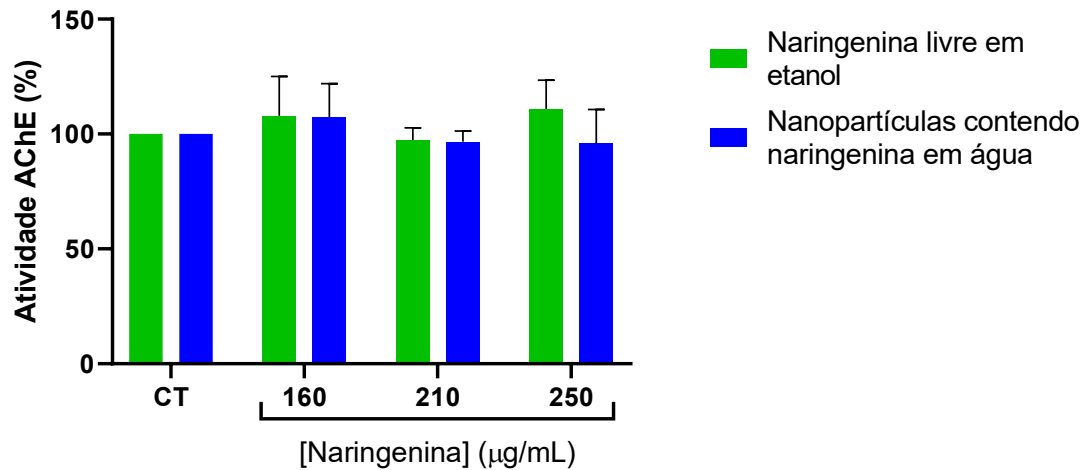
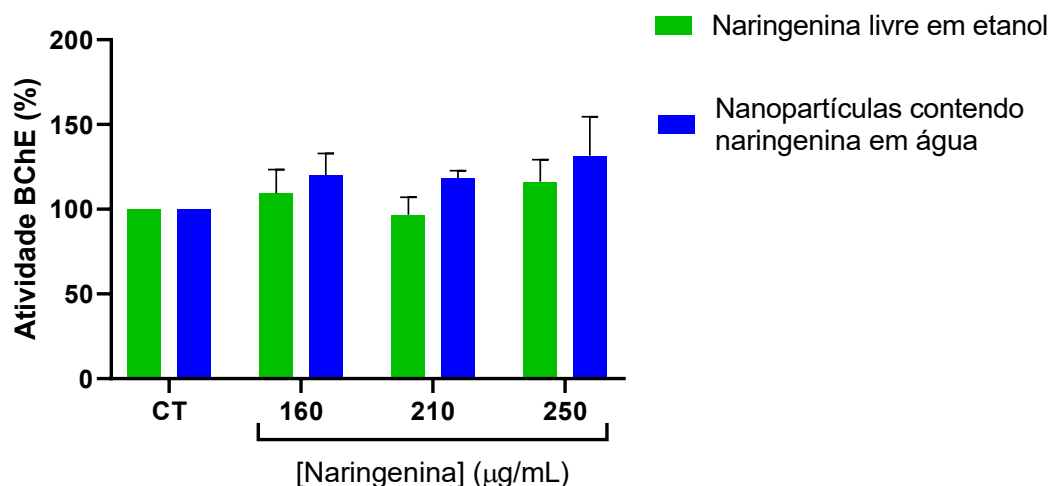


Figura 11. Efeito da naringenina e da dispersão sólida contendo naringenina sobre a atividade da enzima BchE *ex vivo* do tecido de *D. melanogaster*.

Para avaliar a atividade da BchE foram utilizados homogeneizados de *D. melanogaster* tratados com diferentes concentrações (160, 210 e 250  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) de naringenina livre diluída em etanol (destaque em verde no gráfico) ou de nanopartículas contendo naringenina diluídas em água (destaque em azul no gráfico). O controle (CT) foi incubado com etanol ou água de acordo com a suplementação utilizada. Diferença significativa entre o grupo controle e o tratamento com naringenina foi determinada por análise de variância unidirecional (ANOVA) seguida pelo pós-teste de Tukey



Fonte: Próprio Autor (2022)

Nos experimentos *in vitro* realizados, a naringenina apresentou inibição não-competitiva em relação a AchE e a BChE. Os inibidores não-competitivos não apresentam

semelhança estrutural em relação ao substrato e a ligação com a enzima ocorre por grupamentos que não pertencem ao sítio ativo, porém a ligação do inibidor não-competitivo a enzima altera sua estrutura enzimática inviabilizando a catálise. O ponto de ligação do inibidor enzimático não competitivo é a cadeia lateral de um aminoácido o grupo OH de serina, ou o grupo OH de cisteína por exemplo que são comumente encontrados em enzimas, ou seja, este tipo de inibidor é bastante inespecífico, podendo atuar sobre outras enzimas (MARZZOOCO, 2015). Contudo, na análise *ex vivo* do tecido de DM não foi encontrada atividade significativa de inibição da naringenina livre e da naringenina encapsulada frente as enzimas AChE e BChE.

Conforme Orhan et al. (2018), a hidrogenação de flavonoides como a naringenina pode diminuir sua a atividade inibitória contra a AChE. Além disso, compostos fenólicos e flavonoides apresentam baixa atividade como inibidores naturais de colinesterases devido a sua capacidade e de se ligar ao sítio ativo da AChE (TAMFU et al., 2021), da mesma forma metabólitos de flavonoides apresentam bioatividade reduzida em comparação aos seus compostos originais (LEE et al., 2018) .

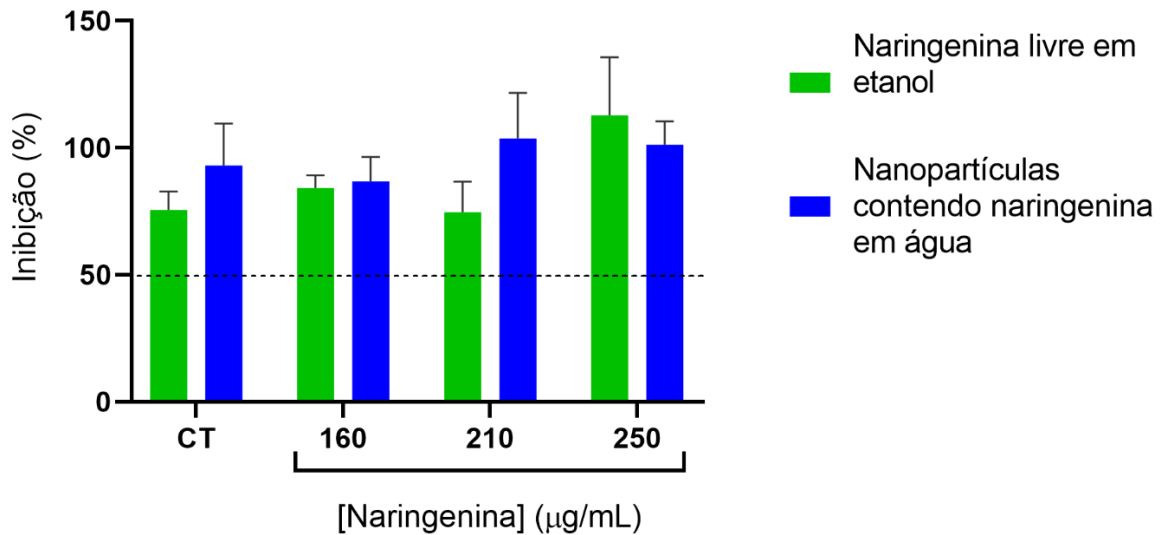
### **5.6. Atividade das enzimas oxidativas SOD e CAT em homogeneizados de *Drosophila melanogaster***

A Figura 12 apresenta os resultados obtidos da análise da atividade da enzima SOD dos homogeneizados suplementados com naringenina livre e com a dispersão sólida contendo naringenina, respectivamente. Foram realizados cinco experimentos independentes de acordo com as amostras obtidas no teste de sobrevivência. A Figura 13 apresenta o perfil antioxidante da naringenina livre e das nanopartículas contendo naringenina determinado usando a atividade da enzima catalase (CAT).

**Figura 12.** Efeito da naringenina livre e nanopartículas contendo naringenina sobre a atividade da enzima SOD *ex vivo* no tecido de *D. melanogaster*

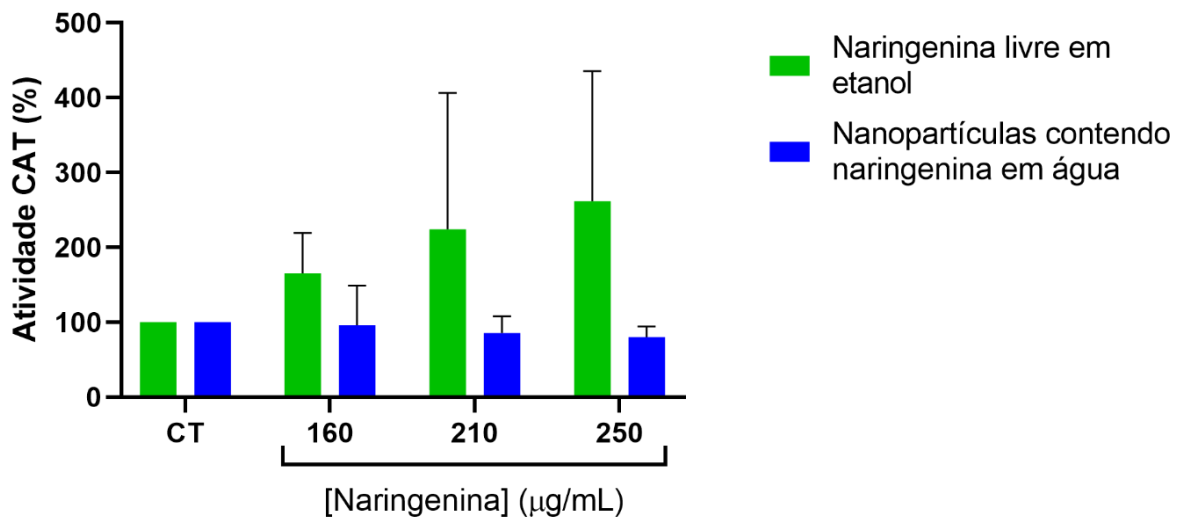
A avaliação da atividade da SOD utilizou homogeneizado de *D. melanogaster* tratado com diferentes concentrações (160, 210 e 250 µg/mL de naringenina livre diluída em etanol (destaque em verde no gráfico) ou da dispersão sólida contendo naringenina diluídas em água (destaque em azul no gráfico).

O controle (CT) foi incubado com etanol. A linha tracejada indica o controle realizado com a quercetina. Diferença significativa entre o grupo controle e o tratamento com naringenina foi determinada por análise de variância unidirecional (ANOVA) seguida pelo pós-teste de Tukey. \*  $p < 0,05$  em comparação ao grupo controle



**Figura 13.** Efeito da naringenina livre e nanopartículas contendo naringeninasobre a atividade da enzima CAT *ex vivo* no tecido de *D. melanogaster*

O homogeneizado de *D. melanogaster* foi utilizado para avaliar a atividade da CAT, sendo que foi tratado com diferentes concentrações (160, 210 e 250 µg/mL) de naringenina livre diluída em etanol (destaque em verde no gráfico) ou da dispersão sólida contendo naringenina diluídas em água (destaque em azul no gráfico). O controle (CT) foi incubado com etanol. Diferença significativa entre o grupo controle e o tratamento com naringenina foi determinada por análise de variância unidirecional (ANOVA) seguida pelo pós-teste de Tukey. \*  $p < 0,05$  em comparação ao grupo controle



Fonte: Próprio Autor (2022)

Pode-se observar que em ambos os experimentos tanto os grupos com suplementação de naringenina livre e de naringenina nanoencapsulada aumentou a auto-oxidação da quercetina, sugerindo que a enzima SOD não foi inibida pelas diferentes concentrações avaliadas. Resultados também obtidos por Ahmad et al. (2020) que observou aumento da atividade da SOD em tecidos de ratos tratados com a utilização de um gel formado pelo uso de quitosana, Poloxamer e naringenina.

Da mesma forma, tratamento de ratos hipertensos com naringenina observou uma melhora significativa no status antioxidante não enzimático tanto nos tecidos renais quanto neuronais, respectivamente, promovendo a diminuição significativa nos produtores de estresse oxidativo e melhora no antioxidante em ratos hipertensos que receberam naringenina, confirmando a ação antioxidante da naringenina (OYAGBEMI et al., 2020).

Na análise da ação da CAT em relação com a naringenina livre e as nanopartículas contendo naringenina foi observado um aumento de sua atividade, embora na análise com as nanopartículas as concentrações de 210 e 250 µg/mL não tenha ocorrido o aumento significativo de atividade de CAT esta diferença não se mostrou significativa em relação ao controle.

O estresse oxidativo pode induzir a uma resposta específica em cada organismo. Existe um mecanismo antioxidante que inclui, entre outros fatores, enzimas antioxidantes que convertem EROS em  $H_2O_2 + O_2$  e a CAT remove  $H_2O_2$ , quando ocorre em altas concentrações. Estudos com ratos diabéticos, observou-se um aumento em ambas as enzimas, e sugere-se então que esta resposta é um mecanismo compensatório que elimina os radicais tóxicos. As diferenças observadas na atividade enzimática da SOD e CAT podem estar relacionadas ao fato de que a resposta ao estresse oxidativo pode variar e depende, entre outros fatores, do nível e duração da exposição as EROs, bem como do contexto celular que acompanha esse estresse (WOJNAR; ZYCH; KACZMARCZYK-SEDLAK, 2018).

Embora a naringenina não seja o antioxidante natural mais potente em comparação com outros flavonoides, como a quercetina, sua capacidade de regular os fatores de transcrição com efeitos antioxidantes o torna superior e pode ser como primeira escolha na mitigação do estresse oxidativo que causa distúrbios metabólicos (LUTU et al., 2019).

## 6. CONCLUSÕES

A naringenina testada *in vitro* frente às enzimas acetilcolinesterase (AChE) e butirilcolinesterase (BChE) apresentou inibição do tipo não-competitiva, concordando com os dados já reportados na literatura. A caracterização das nanopartículas contendo naringenina demonstrou que a matriz polimérica aprisionou a naringenina de forma eficaz. Os testes de sobrevivência realizados com as *Drosophila melanogaster* não apresentaram letalidade nas doses que foram testadas, o que sugere baixa toxicidade da naringenina e sua dispersão sólida. Os testes *ex vivo*, visando confirmar a atividade da naringenina e sua dispersão sólida, não apresentaram diferenças significativas frente às enzimas AChE e BChE. Os testes com as enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) confirmam os resultados encontrados na literatura e corroboram para a atividade antioxidante da naringenina já apresentada. Diante desses resultados concomitantes com os apresentados na literatura, a naringenina apresenta potencial para ser utilizada em tratamento alternativo juntamente com tratamentos já utilizados para doenças como a DA.

## REFERÊNCIAS

- ADEDARA, I. A. et al. Utility of cockroach as a model organism in the assessment of toxicological impacts of environmental pollutants. **Environmental Advances**, p. 100195, 2022.
- AEBI, H. [13] Catalase in vitro. **Methods in Enzymology**, v. 105, n. C, p. 121–126, 1 jan. 1984.
- AFANAS, I. B. et al. CHELATING AND FREE RADICAL SCAVENGING MECHANISMS OF INHIBITORY ACTION OF RUTIN AND QUERCETIN IN LIPID PEROXIDATION. **Biochemical Pharmacology**, v. 3, p. 1763–1769, 5 dez. 1989.
- AHMAD, N. et al. Saudi Journal of Biological Sciences Poloxamer-chitosan-based Naringenin nanoformulation used in brain targeting for the treatment of cerebral ischemia. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 27, n. 1, p. 500–517, 2020.
- ALMEIDA, H. H. S. et al. Bioactive evaluation and application of different formulations of the natural colorant curcumin (E100) in a hydrophilic matrix (yogurt). **Food Chemistry**, v. 261, p. 224–232, 2018a.
- AMIN, I. et al. **Naringenin (4,5,7-trihydroxyflavanone) as a potent neuroprotective agent: From chemistry to medicine**. 1. ed. [s.l.] Elsevier B.V., 2020a. v. 65
- 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. Physiological changes and antioxidant enzyme activity in Biquinho and Malagueta pepper seeds during the maturation process. **Revista Ceres**, v. 65, n. 6, p. 534–545, 2018.
- ARAUJO, S. M. et al. Effectiveness of  $\gamma$ -oryzanol in reducing neuromotor deficits, dopamine depletion and oxidative stress in a *Drosophila melanogaster* model of Parkinson's disease induced by rotenone. **NeuroToxicology**, v. 51, p. 96–105, 2015.
- BECKETT, A. H.; VAUGHAN, C. L.; MITCHARD, M. The synthesis of some analogues of butyrylcholine and their hydrolysis by a purified horse serum cholinesterase. **Biochemical Pharmacology**, v. 17, n. 8, p. 1591–1594, 1968.
- BHANDARI, R.; PALIWAL, J. K.; KUHAD, A. Naringenin and its nanocarriers as potential phytotherapy for autism spectrum disorders. **Journal of Functional Foods**, v. 47, n. May, p. 361–375, 2018.

BUDEL, R. G. et al. Colloids and Surfaces B : Biointerfaces Toxicological evaluation of naringin-loaded nanocapsules in vitro and in vivo. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 188, n. November 2019, p. 110754, 2020.

CERONI, F. L.; VANIN, A. B. Estudo Cinético Das Enzimas Hidrolases Quimosina E Lactase Em Leite Bovino / Kinetic Study of the Enzymes Chymosin Hydrolases and Lactase in Bovine Milk. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 2, p. 19040–19053, 2021.

CHAURASIA, S. et al. Potential of Cationic-Polymeric Nanoparticles for Oral Delivery of Naringenin: In Vitro and In Vivo Investigations. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 107, n. 2, p. 706–716, 2018a.

CHIOU, W. I. N. L.; RIEGELMANT, S. Pharmaceutical sciences Pharmaceutical Applications of Solid. v. 60, n. 9, p. 1281–1302, 1971.

CUI, W. et al. Naringenin Cocrystals Prepared by Solution Crystallization Method for Improving Bioavailability and Anti-hyperlipidemia Effects. **AAPS PharmSciTech**, v. 20, n. 3, 1 abr. 2019.

DE JONG, A. Less is better. Avoiding redundant measurements in studies on wild birds in accordance to the principles of the 3Rs. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 6, n. JUN, p. 1–13, 2019.

DE MENESES, A. C. et al. Encapsulation of clove oil in nanostructured lipid carriers from natural waxes: Preparation, characterization and in vitro evaluation of the cholinesterase enzymes. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 583, n. August, p. 123879, 2019.

DE OLIVEIRA, G. A. V.; DA SILVA, J. M. S. F. Equilíbrio Químico E Cinética Enzimática Da Interação De  $\alpha$ -Amilase Com Compostos Fenólicos Encontrados Em Cerveja. **Quimica Nova**, v. 40, n. 7, p. 726–732, 2017.

DOKE, S. K.; DHAWALE, S. C. Alternatives to animal testing: A review. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 23, n. 3, p. 223–229, 2015.

ELLMAN, G. L. Tissue Sulfyd Groups. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, p. 70–77, 1959a.

FOURNIER, D. et al. Drosophila melanogaster acetylcholinesterase gene. Structure, evolution and mutations. **Journal of Molecular Biology**, v. 210, n. 1, p. 15–22, 1989.

GALATI, G.; O'BRIEN, P. J. Potential toxicity of flavonoids and other dietary phenolics: Significance for their chemopreventive and anticancer properties. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 37, n. 3, p. 287–303, 2004.



GRATIERY, T. et al. Hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin-complexed naringenin by solvent change precipitation for improving anti-inflammatory effect in vivo. **Carbohydrate Polymers**, v. 231, n. December 2019, p. 115769, 2020.

GRELLA MIRANDA, C. et al. Influence of nanoencapsulated lutein on acetylcholinesterase activity: In vitro determination, kinetic parameters, and in silico docking simulations. **Food Chemistry**, v. 307, n. September 2019, p. 125523, 2020a.

GRELLA MIRANDA, C. et al. Influence of nanoencapsulated lutein on acetylcholinesterase activity: In vitro determination, kinetic parameters, and in silico docking simulations. **Food Chemistry**, v. 307, n. September 2019, p. 125523, 2020b.

GUAN, M. et al. Characterization, in vitro and in vivo evaluation of naringenin-hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin inclusion for pulmonary delivery. **Molecules**, v. 25, n. 3, 28 jan. 2020.

HEIDARY MOGHADDAM, R. et al. **Naringenin and naringin in cardiovascular disease prevention: A preclinical review. European Journal of Pharmacology** Elsevier B.V., , 15 nov. 2020.

HELENO, S. A. et al. Laboratory of Separation and Reaction Engineering – Laboratory of Catalysis and Materials Post-Graduation Program of Food Technology ( PPGTA ), Federal University of Technology Chemical and Food Engineering Department , Federal University of Santa Catarina. **Food Chemistry**, 2018a.

HELENO, S. A. et al. Laboratory of Separation and Reaction Engineering – Laboratory of Catalysis and Materials Post-Graduation Program of Food Technology ( PPGTA ), Federal University of Technology Chemical and Food Engineering Department , Federal University of Santa Catarina. **Food Chemistry**, 2018b.

IGHODARO, O. M.; AKINLOYE, O. A. First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. **Alexandria Journal of Medicine**, v. 54, n. 4, p. 287–293, 1 dez. 2018.

JOSHI, R.; KULKARNI, Y. A.; WAIRKAR, S. Pharmacokinetic , pharmacodynamic and formulations aspects of Naringenin : An update. **Life Sciences**, v. 215, n. July, p. 43–56, 2018a.

JOSHI, R.; KULKARNI, Y. A.; WAIRKAR, S. Pharmacokinetic , pharmacodynamic and formulations aspects of Naringenin : An update. **Life Sciences**, v. 215, n. July, p. 43–56, 2018b.

- JOSHI, R.; KULKARNI, Y. A.; WAIRKAR, S. Pharmacokinetic , pharmacodynamic and formulations aspects of Naringenin : An update. **Life Sciences**, v. 215, n. July, p. 43–56, 2018c.
- KAPOOR, R. et al. ScienceDirect axis and inducing apoptosis in rats. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 70, p. 215–226, 2019.
- KARIM, N. et al. A recent review of citrus flavanone naringenin on metabolic diseases and its potential sources for high yield-production. **Trends in Food Science and Technology**, v. 79, p. 35–54, 2018.
- KERDUDO, A. et al. Encapsulation of rutin and naringenin in multilamellar vesicles for optimum antioxidant activity. **FOOD CHEMISTRY**, v. 159, p. 12–19, 2014.
- 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. 41, n. 5, p. 772–779, 2015.
- KHAN, H. et al. Flavonoids as acetylcholinesterase inhibitors: Current therapeutic standing and future prospects. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 101, n. March, p. 860–870, 2018.
- KHAN, K. U.; AKHTAR, N.; MINHAS, M. U. Poloxamer-407-Co-Poly (2-Acrylamido-2-Methylpropane Sulfonic Acid) Cross-linked Nanogels for Solubility Enhancement of Olanzapine: Synthesis, Characterization, and Toxicity Evaluation. **AAPS PharmSciTech**, v. 21, n. 5, 1 jul. 2020.
- KLIMACZEWSKI, C. V. et al. Peumus boldus attenuates copper-induced toxicity in *Drosophila melanogaster*. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 97, n. September 2017, p. 1–8, 2018.
- KUMAR, S. P. et al. International Journal of Biological Macromolecules Antioxidant studies of chitosan nanoparticles containing naringenin and their cytotoxicity effects in lung cancer cells. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 78, p. 87–95, 2015.
- KUROZAWA, L. E.; PARK, K. J.; HUBINGER, M. D. Influence Of Process Conditions On Enzymatic Hydrolysis Kinetics Of Chicken Meat [influência Das Condições De Processo Na Cinética De Hidrólise Enzimática De Carne De Frango]. **Food Science and Technology**, v. 29, n. 3, p. 557–566, 2009.
- LEE, S. et al. In silico docking and in vitro approaches towards BACE1 and cholinesterases inhibitory effect of citrus flavanones. **Molecules**, v. 23, n. 7, p. 1–12, 2018.

- LEMES, G. F. et al. Enzymatically crosslinked gelatin coating added of bioactive nanoparticles and antifungal agent: Effect on the quality of Benitaka grapes. **LWT**, v. 84, p. 175–182, out. 2017.
- LEMES, L. F. N. et al. Cardanol-derived AChE inhibitors: Towards the development of dual binding derivatives for Alzheimer's disease. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 108, p. 687–700, 2016.
- LI, F. et al. Black soybean seed coat extract protects *Drosophila melanogaster* against Pb toxicity by promoting iron absorption. **Journal of Functional Foods**, v. 75, n. July, p. 104201, 2020.
- 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
- 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.
- LUSHCHEKINA, S. V; MASSON, P. Neuropharmacology Slow-binding inhibitors of acetylcholinesterase of medical interest. **Neuropharmacology**, v. 177, n. July, p. 108236, 2020.
- LUTU, M. R. et al. **DNA polymerase- $\gamma$  hypothesis in nucleoside reverse transcriptase-induced mitochondrial toxicity revisited: A potentially protective role for citrus fruit-derived naringenin?** **European Journal of Pharmacology** Elsevier B.V., , 5 jun. 2019.
- MAITY, S. et al. Alginate coated chitosan core-shell nanoparticles for efficient oral delivery of naringenin in diabetic animals — An in vitro and in vivo approach. **Carbohydrate Polymers**, v. 170, p. 124–132, 2017a.
- MAITY, S. et al. Alginate coated chitosan core-shell nanoparticles for efficient oral delivery of naringenin in diabetic animals—An in vitro and in vivo approach. **Carbohydrate Polymers**, v. 170, p. 124–132, 15 ago. 2017b.
- MALGARIM, L. et al. Desenvolvimento , Caracterização e Avaliação da Citotoxicidade de Naringina e Naringenina Nanoencapsuladas. v. 1, n. December 2015, 2016.
- MARINHO, C. S. et al. Characterization and kinetic study of the brain and muscle acetylcholinesterase from *Danio rerio*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part - C: Toxicology and Pharmacology**, v. 222, n. December 2018, p. 11–18, 2019.

- MARQUES, P. R. B. DE O.; YAMANAKA, H. Biossensores Baseados no processo de inibição enzimática. v. 31, n. 7, p. 1791–1799, 2008.
- MARZZOOCO ANITA, B. B. T. **Bioquímica Basica**. 2ª Edição ed. Rio de Janeiro - RJ: Guanabara Koogan S.A., 1999.
- MARZZOOCO ANITA, B. B. T. **Bioquímica Basica**. 4 ed ed. Rio de Janeiro - RJ: Guanabara Koogan S.A., 2015.
- MEHTA, M.; ADEM, A.; SABBAGH, M. New acetylcholinesterase inhibitors for alzheimer's disease. **International Journal of Alzheimer's Disease**, v. 2012, 2012.
- MORA AGÜERO, S. D. LOS Á.; ZELEDÓN AGUILERA, A. S.; VARGAS RUBIO, T. Estrés oxidativo y antioxidantes: efectos en el embarazo. **Revista Medica Sinergia**, v. 4, n. 5, p. 89–100, 1 maio 2019.
- NAKAJIMA, V. M.; MACEDO, G. A.; MACEDO, J. A. LWT - Food Science and Technology Citrus bioactive phenolics : Role in the obesity treatment. **LWT - Food Science and Technology**, v. 59, n. 2, p. 1205–1212, 2014.
- NELSON, D. L.; COX, M. M. **Principios de Bioquímica de Lehninger[recurso eletrônico]/David L. Nelson, Michael M. Cox**. 6ª Edição ed. Porto Alegre - RS: ARTMED, 2014a.
- NELSON, D. L.; COX, M. M. **Principios de Bioquímica de Lehninger[recurso eletrônico]/David L. Nelson, Michael M. Cox**. 6ª Edição ed. Porto Alegre - RS: ARTMED, 2014b.
- ORHAN, I. E. et al. Molecular modeling and in vitro approaches towards cholinesterase inhibitory effect of some natural xanthohumol, naringenin, and acyl phloroglucinol derivatives. **Phytomedicine**, v. 42, n. January, p. 25–33, 2018a.
- ORHAN, I. E. et al. Molecular modeling and in vitro approaches towards cholinesterase inhibitory effect of some natural xanthohumol, naringenin, and acyl phloroglucinol derivatives. **Phytomedicine**, v. 42, n. January, p. 25–33, 2018b.
- ORHAN, I. E. et al. Molecular modeling and in vitro approaches towards cholinesterase inhibitory effect of some natural xanthohumol, naringenin, and acyl phloroglucinol derivatives. **Phytomedicine**, v. 42, n. January, p. 25–33, 2018c.
- OYAGBEMI, A. A. et al. Antihypertensive power of Naringenin is mediated via attenuation of mineralocorticoid receptor (MCR)/ angiotensin converting enzyme (ACE)/ kidney injury molecule (Kim-1) signaling pathway. **European Journal of Pharmacology**, v. 880, 5 ago. 2020.

- PÉREZ-COLL, C. S.; HERKOVITS, J. Lethal and teratogenic effects of naringenin evaluated by means of an amphibian embryo toxicity test (AMPHITOX). **Food and Chemical Toxicology**, v. 42, n. 2, p. 299–306, 2004.
- PINHO-RIBEIRO, F. A. et al. The citrus flavonone naringenin reduces lipopolysaccharide-induced inflammatory pain and leukocyte recruitment by inhibiting NF- $\kappa$ B activation. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 33, p. 8–14, 2016.
- POETINI, M. R. et al. Hesperidin attenuates iron-induced oxidative damage and dopamine depletion in *Drosophila melanogaster* model of Parkinson's disease. **Chemico-Biological Interactions**, v. 279, n. September 2017, p. 177–186, 2018a.
- POETINI, M. R. et al. Hesperidin attenuates iron-induced oxidative damage and dopamine depletion in *Drosophila melanogaster* model of Parkinson's disease. **Chemico-Biological Interactions**, v. 279, p. 177–186, 5 jan. 2018b.
- RIBEIRO, M. H. Naringinases: Occurrence, characteristics, and applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 90, n. 6, p. 1883–1895, 2011.
- ROCHE, M. et al. Olive phenols efficiently inhibit the oxidation of serum albumin-bound linoleic acid and butyrylcholine esterase. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, v. 1790, n. 4, p. 240–248, 2009.
- SARKAR, B.; ULLAH, M.; PROTTOY, N. I. Computational Exploration of Phytochemicals as Potent Inhibitors of Acetylcholinesterase Enzyme in Alzheimer's Disease. p. 1–76, 2020.
- SARRIA, A. L. F. et al. Copper (II) and zinc (II) complexes with flavanone derivatives: Identification of potential cholinesterase inhibitors by on-flow assays. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 164, p. 141–149, 2016.
- SEPASI TEHRANI, H.; MOOSAVI-MOVAHEDI, A. A. **Catalase and its mysteries. Progress in Biophysics and Molecular Biology** Elsevier Ltd, , 1 dez. 2018.
- SERAJUDDIN, A. T. M. Solid dispersion of poorly water-soluble drugs: Early promises, subsequent problems, and recent breakthroughs. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 88, n. 10, p. 1058–1066, out. 1999.
- SHPIGELMAN, A. et al. Food Hydrocolloids b -Lactoglobulin e naringenin complexes : Nano-vehicles for the delivery of a hydrophobic nutraceutical. **Food hydrocolloids**, v. 40, p. 214–224, 2014.
- 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. November 2018, p. 29–37, 2019.

- SILVA-BUZANELLO, R. A. DA et al. Preparation of curcumin-loaded nanoparticles and determination of the antioxidant potential of curcumin after encapsulation. **Polímeros**, v. 26, n. 3, p. 207–214, ago. 2016.
- STAATS, S. et al. Drosophila melanogaster as a Versatile Model Organism in Food and Nutrition Research. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 66, n. 15, p. 3737–3753, 2018.
- STEPHENIE, S. et al. **An insight on superoxide dismutase (SOD) from plants for mammalian health enhancement.** **Journal of Functional Foods** Elsevier Ltd, , 1 maio 2020.
- SZAFRANIEC, J. et al. Enhanced dissolution of solid dispersions containing bicalutamide subjected to mechanical stress. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 542, n. 1–2, p. 18–26, 5 maio 2018.
- TAMFU, A. N. et al. **Non-alkaloid cholinesterase inhibitory compounds from natural sources.** **Molecules** MDPI, , 1 set. 2021.
- UMUKORO, S. et al. Naringenin attenuates behavioral derangements induced by social defeat stress in mice via inhibition of acetylcholinesterase activity, oxidative stress and release of pro-inflammatory cytokines. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 105, n. May, p. 714–723, 2018.
- VELLOSA, J. C. R. et al. ESTRESSE OXIDATIVO: UMA INTRODUÇÃO AO ESTADO DA ARTE / OXIDATIVE STRESS: AN INTRODUCTION TO THE STATE OF ART. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 1, p. 10152–10168, 2021.
- WHITE, J. M.; CALABRESE, M. A. Impact of small molecule and reverse poloxamer addition on the micellization and gelation mechanisms of poloxamer hydrogels. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 638, n. January, p. 128246, 2022.
- WOJNAR, W.; ZYCH, M.; KACZMARCZYK-SEDLAK, I. Antioxidative effect of flavonoid naringenin in the lenses of type 1 diabetic rats. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 108, p. 974–984, 1 dez. 2018.
- WU, J. et al. Design, synthesis and biological evaluation of naringenin carbamate derivatives as potential multifunctional agents for the treatment of Alzheimer's disease. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 49, n. June, p. 128316, 2021.
- YANG, F. et al. Naringenin loaded multifunctional nanoparticles to enhance the chemotherapeutic efficacy in hepatic fibrosis. **Biomedical Microdevices**, v. 22:68, 21 set. 2020.

YENER, I. et al. Selective in vitro and in silico enzymes inhibitory activities of phenolic acids and flavonoids of food plants: Relations with oxidative stress. **Food Chemistry**, v. 327, p. 127045, 2020.

ZHANG, P. et al. Preparation and evaluation of naringenin-loaded sulfobutylether- $\beta$ -cyclodextrin / chitosan nanoparticles for ocular drug delivery. **Carbohydrate Polymers**, v. 149, p. 224–230, 2016.

ZHOU, L. et al. Solubility of chrysin in ethanol and water mixtures. **Journal of Chemical and Engineering Data**, v. 59, n. 7, p. 2215–2220, 2014.