

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

**IGOR SILVA DE SÁ**

**NANOENCAPSULAÇÃO DE CURCUMINA E AVALIAÇÃO *in vitro* DA ATIVIDADE  
DAS ENZIMAS AChE, BChE E GST EM TECIDOS BIOLÓGICOS DE *Drosophila  
melanogaster***

Campo Mourão

2018

IGOR SILVA DE SÁ

**NANOENCAPSULAÇÃO DE CURCUMINA E AVALIAÇÃO *in vitro* DA ATIVIDADE  
DAS ENZIMAS AChE, BChE E GST EM TECIDOS BIOLÓGICOS DE *Drosophila  
melanogaster***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de mestre em Tecnologia de Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Rafael Porto Ineu

Coorientador: Prof. Dr. Odinei Hess Gonçalves

Campo Mourão

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

S111n Sá, Igor Silva de

Nanoencapsulação de curcumina e avaliação in vitro da atividade das enzimas AChE, BChE e GST em tecidos biológicos de *Drosophila melanogaster* / Igor Silva de Sá – 2018.

55 f.: il.; 30 cm.

Orientador: Rafael Porto Ineu

Coorientador: Odinei Hess Gonçalves

Dissertação (Mestrado) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos. Campo Mourão, 2018.

Inclui bibliografias.

1. Compostos bioativos das plantas. 2. Enzimas – Aplicações industriais. 3. Sistemas biológicos 4. Alimentos – Dissertações. I. Ineu, Rafael Porto, orient. II. Gonçalves, Odinei Hess, coorient. III. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos. IV. Título.

CDD: 664

Biblioteca Câmpus Medianeira

Marci Lucia Nicodem Fischborn CRB 9/1219



## **TERMO DE APROVAÇÃO**

### **NANOENCAPSULAÇÃO DE CURCUMINA E AVALIAÇÃO *in vitro* DA ATIVIDADE DAS ENZIMAS AChE, BChE E GST EM TECIDOS BIOLÓGICOS DE *Drosophila melanogaster***

Por

**IGOR SILVA DE SÁ**

Essa dissertação foi apresentada às catorze horas, do dia seis de dezembro de dois mil e dezoito, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Tecnologia de Alimentos, Linha de Pesquisa Processos Tecnológicos na Indústria de Alimentos, no Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos - PPGTA, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná. O candidato foi arguido pela Banca Examinadora composta pelos professores abaixo assinados. Após deliberação, a Banca Examinadora considerou o trabalho aprovado.

---

Prof. Dr. Rafael Porto Ineu (Orientador – PPGTA)

---

Profa. Dra. Ailey Aparecida Coelho Tanamati (Membro Externo – UTFPR)

---

Prof. Dr. Jurandir Fernando Comar (Membro Externo – UEM)

\*via original com assinaturas encontra-se na secretaria do programa

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus e a toda minha família, especialmente aos meus pais Serafim Gomes de Sá e Valdelice Nascimento Silva de Sá, aos meus irmãos, Hesley Silva de Sá e Heliton Serafim de Sá e a minha namorada Eloah Rocha de Oliveira, que em todos momentos, com todas dificuldades enfrentadas e quando pensei em desistir, eles estavam apostos para me apoiar tanto financeiramente como com palavras de incentivo e apoio.

Agradeço ao meu orientador, Dr. Rafael Porto Ineu, pela disponibilidade de ensinar e acompanhar cada passo na produção deste trabalho, de todo conhecimento transmitido e de me apoiar, como amigo, em momentos difíceis passados nesses apx. dois anos. Também agradeço ao meu coorientador Dr. Odinei Hess Gonçalves, pela paciência e persistência, por toda experiência e conhecimento transmitido e apoio no trabalho. A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos (PPGTA), dentre eles Dr. Evandro Bona, Dra. Ailey Aparecida Coelho Tanamati pelo convívio e parceria.

Agradeço aos meus colegas de pesquisa, Felipe Rocha, Camila Leme, Guilherme Basconi Scandelai e Carlos Seiti, que de alguma forma ajudaram na produção do trabalho.

Agradeço por cada amigo e colega constituído nesse período do mestrado, pelos momentos juntos e todo o apoio, dentre eles Tamires Barlati, Silvio José, Daniela Harita, Sabrina Fortini Spoladore, Natara Tosoni, Gustavo Makimori, Priscila Freitas, Valquíria Maeda, Thaysa Moya, Anielle Oliveira, Tatiane Vieira, Franciele Viell, Mariana Braga, Michel Rocha, Luana Tabalipa.

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

## RESUMO

A curcumina (CUR) é o principal composto polifenólico bioativo presente nos rizomas da cúrcuma (*Curcuma longa* L.) e possui características já conhecidas como antioxidantes, anti-inflamatórias e neuroprotetoras. Sua baixa biodisponibilidade, insolubilidade em água e instabilidade limitam sua aplicação, dificultando sua ação e absorção em determinados tecidos. Várias técnicas podem ser usadas para melhorar a dissolução e biodisponibilidade de bioativos pouco solúveis em água, dentre elas existe as dispersões sólidas. O objetivo desse estudo foi produzir nanopartículas de CUR encapsuladas pelos polímeros poli(etileno glicol) 6000 (PEG) e Poloxamer 407 (P407) e caracterizadas por Microscopia Eletrônica de Transmissão, Difração a Laser, Calorimetria Diferencial de Varredura, Espectrofotometria no Infravermelho e Difração de Raios-X. Posteriormente examinou-se seus efeitos *in vitro* na atividade das enzimas glutathione S-transferase (GST), acetilcolinesterase (AChE) e butirilcolinesterase (BChE) de tecido de *Drosophila melanogaster*. Os resultados obtidos mostraram nanopartículas com formatos irregulares, sendo que 50% das partículas apresentaram diâmetros menores que  $0,937 \pm 0,010 \mu\text{m}$  para ambos os encapsulantes poliméricos utilizados. As técnicas físico-químicas de caracterização mostraram que a CUR foi efetivamente encapsulada, possibilitando a dissolução da CUR em tampão fosfato e água. A CUR encapsulada em P407 modulou a atividade das enzimas AChE, BChE e GST com  $IC_{50}$  de 27,99  $\mu\text{M}$ , 24,89  $\mu\text{M}$  e 8,86  $\mu\text{M}$ , respectivamente. Quando o PEG foi usado como encapsulante, a CUR também modulou a atividade enzimática, porém em concentrações maiores. A partir disso, conclui-se que a dispersão sólida manteve as características da CUR livre sobre a modulação das enzimas AChE, BChE e GST em testes *in vitro* a partir do tecido da DM, sendo um indicativo do aumento da sua biodisponibilidade.

**Palavras-chave:** Bioativos. Nanopartículas. Dispersão Sólida. Poloxamer 407. Poli(etileno glicol). Acetilcolinesterase. Butirilcolinesterase. Glutathione S-transferase.

## ABSTRACT

Curcumin (CUR) is the main bioactive polyphenolic compound present in curcuma rhizomes (*Curcuma longa* L.), and has characteristics already known as antioxidants, anti-inflammatory and neuroprotective. Its low bioavailability, water insolubility and instability limit its application, hindering its action and absorption in certain tissues. Several techniques can be used to improve the dissolution and bioavailability of poorly water-soluble bioactive, among which are solid dispersions. Objective of this study was to produce CUR nanoparticles encapsulated by Poly (ethylene glycol) 6000 (PEG) and Poloxamer 407 (P407) polymers and characterized by Transmission Electron Microscopy, Laser Diffraction, Differential Scanning Calorimetry, Infrared Spectrophotometry and X-ray diffraction. Its *in vitro* effects on glutathione S-transferase (GST), acetylcholinesterase (AChE) and butyrylcholinesterase (BChE) activity of *Drosophila melanogaster* (DM) tissue were examined. Results showed nanoparticles with irregular shapes, with 50% of particles having diameters smaller than  $0.937 \pm 0.010 \mu\text{m}$  for both polymeric encapsulants used. Physicochemical characterization techniques showed that the CUR was effectively encapsulated, allowing the dissolution of CUR in phosphate buffer and water. CUR encapsulated in P407 modulated the activity of the AChE, BChE and GST enzymes with  $\text{IC}_{50}$  of 27.99  $\mu\text{M}$ , 24.89  $\mu\text{M}$  and 8.86  $\mu\text{M}$ , respectively. When PEG was used as an encapsulant, CUR also modulated the enzymatic activity, but at higher concentrations. From this, it's concluded that solid dispersion maintained the characteristics of the free CUR on the modulation in enzymes AChE, BChE and GST *in vitro* tests from the tissue of the DM, being indicative of the increase in its bioavailability.

**Keywords:** Bioactive. Nanoparticles. Solid dispersion. Poloxamer 407. Poly (ethylene glycol). Acetylcholinesterase. Butyrylcholinesterase. Glutathione S-transferase.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Estrutura química da curcumina.....	16
Figura 2.	Estruturas químicas do (a) Poloxamer 407 e (b) poli(etileno glicol) (PEG) .....	18
Figura 3.	Estrutura tridimensional da AChE de <i>Drosophila melanogaster</i> .	20
Figura 4.	Atividade da AChE na sinapse colinérgica .....	21
Figura 5.	Estrutura tridimensional da GST de <i>Drosophila melanogaster</i> ..	23
Figura 6.	Ciclo de vida das <i>Drosophila melanogaster</i> .....	24
Figura 7.	Micrografias das nanopartículas obtidas por Microscopia Eletrônica de Transmissão .....	31
Figura 8.	Distribuição dos tamanhos das nanopartículas determinados por difração de laser .....	32
Figura 9.	Dispersões aquosas de curcumina pura (esquerda), nanopartículas PEG-curcumina (centro) e nanopartículas P407-curcumina (direita) .....	32
Figura 10.	Termogramas das nanopartículas (a) PEG-curcumina (b) P407 curcumina .....	33
Figura 11.	Termogramas das misturas físicas (a) PEG e curcumina e (b) P407 e curcumina .....	34
Figura 12.	Espectros de FTIR das nanopartículas de (a) PEG-curcumina e (b) P407-curcumina .....	36
Figura 13.	Espectros de FTIR das misturas físicas de (a) PEG-curcumina e (b) P407-curcumina .....	37
Figura 14.	Padrões de Difração de Raios-X para (a) PEG-curcumina e (b) P407-curcumina .....	38
Figura 15.	Efeitos das nanopartículas de PEG-curcumina e da curcumina sobre a atividade das enzimas (a) AChE e (b) BChE no tecido de <i>Drosophila melanogaster</i> . Valores expressos em média $\pm$ SEM (n = 4 por grupo). Significância determinada pela análise de variância unidirecional (ANOVA) seguida do teste de Tukey. * p <0,05; *** p <0,001; **** p <0,0001 em comparação ao controle.....	40



- Figura 16. Efeitos de nanopartículas de P407-curcumina e curcumina na atividade das enzimas (a) AChE e (b) BChE em tecido de *Drosophila melanogaster*. Valores expressos em média  $\pm$  SEM (n = 4 por grupo). Significância determinada pela análise de variância unidirecional (ANOVA) seguida do teste de Tukey. \* p <0,05; \*\*\* p <0,001; \*\*\*\* p <0,0001 em comparação ao controle..... 41
- Figura 17. Efeitos das nanopartículas de PEG-curcumina e da curcumina na atividade da enzima GST no tecido de *Drosophila melanogaster*. Valores expressos em média  $\pm$  SEM (n = 4 por grupo). Significância determinada pela análise de variância unidirecional (ANOVA) seguida do teste de Tukey. \*\* p <0,01; \*\*\* p <0,001; \*\*\*\* p <0,0001 em comparação ao controle..... 43
- Figura 18. Efeitos das nanopartículas de P407-curcumina e da curcumina na atividade da enzima GST no tecido de *Drosophila melanogaster*. Valores expressos em média  $\pm$  SEM (n = 4 por grupo). Significância determinada pela análise de variância unidirecional (ANOVA) seguida do teste de Tukey. \*\* p <0,01; \*\*\*\* p <0,0001 em comparação ao controle..... 43

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>ACh</b>	Acetilcolina
<b>AChE</b>	Acetilcolinesterase
<b>BChE</b>	Butirilcolinesterase
<b>CDNB</b>	1-Cloro-2,4-dinitrobenzeno
<b>ChE</b>	Colinesterase
<b>CMC</b>	Concentração Micelar Crítica
<b>DM</b>	<i>Drosophila melanogaster</i>
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>DRX</b>	Difração de Raios-X
<b>DSC</b>	Calorímetro Diferencial de Varredura
<b>DTNB</b>	5,5'-Dithiobis (ácido 2-nitrobenzóico)
<b>ECVAM</b>	Centro Europeu de Validação de Métodos Alternativos
<b>EROs</b>	Espécies reativas de oxigênio
<b>FDA</b>	<i>Food and Drug Administration</i>
<b>FTIR</b>	Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier
<b>GRAS</b>	<i>Generally Accepted As Safe</i>
<b>GSH</b>	Glutathiona reduzida
<b>GST</b>	Glutathiona S-transferase
<b>KBr</b>	Brometo de potássio
<b>NPs</b>	Nanopartículas
<b>P407</b>	Poloxamer 407
<b>P407-curcumina</b>	Nanopartículas de curcumina nanoencapsuladas por Poloxamer 407
<b>PEG</b>	Poli(etileno glicol)
<b>PEG-curcumina</b>	Nanopartículas de curcumina nanoencapsuladas por poli(etileno glicol)
<b>Tris-HCl</b>	Hidroximetil aminometano
<b>UV-vis</b>	Ultravioleta e visível
<b>IC50</b>	Media da inibição de um composto (50% de inibição)

## SUMÁRIO

<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>12</b>
<b>2.</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>14</b>
2.1.	OBJETIVO GERAL .....	14
2.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	14
<b>3.</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>15</b>
3.1.	CURCUMINA .....	15
3.2.	TÉCNICAS DE ENCAPSULAÇÕES .....	16
3.2.1.	Matrizes Poliméricas .....	18
3.3.	ATIVIDADE ENZIMÁTICA .....	19
3.3.1.	Sistema Colinérgico .....	20
3.3.2.	Estresse Oxidativo .....	22
3.4.	SISTEMA BIOLÓGICO .....	23
<b>4.</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>26</b>
4.1.	MATERIAIS .....	26
4.2.	OBTENÇÃO DE NANOPARTÍCULAS PEG-CURCUMINA .....	26
4.3.	SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS DE P407-CURCUMINA .....	27
4.4.	CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS .....	27
4.5.	ANÁLISES BIOLÓGICAS ( <i>in vitro</i> ) .....	28
4.5.1.	Preparação do Homogeneizado .....	28
4.5.2.	Atividade da AChE .....	28
4.5.3.	Atividade da BChE .....	29
4.5.4.	Atividade da GST .....	29
4.5.5.	Determinação de Proteína .....	30
4.5.6.	Análise Estatística .....	30
<b>5.</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>31</b>
5.1.	CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS .....	31
5.2.	ANÁLISES ENZIMÁTICAS .....	39
5.2.1.	Colinesterases .....	39
5.2.2.	Glutathione S-transferase (GST) .....	42
<b>6.</b>	<b>CONCLUSÕES E TRABALHOS FUTUROS .....</b>	<b>45</b>
<b>7.</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>46</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A curcumina ( $C_{21}H_{20}O_6$ ) é o principal componente ativo da cúrcuma ou açafrão-da-terra apresenta coloração amarela-alaranjada e é originalmente isolado dos rizomas da planta *Curcuma longa* L. A cúrcuma, pertence à família dos curcuminóides e durante séculos tem sido utilizada como medicamento tradicional e frequentemente utilizada na culinária como tempero com destaque ao caril (*curry*) (mistura de especiarias) com sua cor e sabor distintos (Prasad, Tyagi e Aggarwal, 2014). Além disso, tornou-se alvo de estudos em diversas áreas de conhecimento devido à variedade de propriedades biológicas que apresenta e principalmente pela atividade antioxidante no combate as EROs (espécies reativas de oxigênio) (Maghsoudi *et al.*, 2017; Prasad e Muralidhara, 2014; Shen *et al.*, 2013).

As EROs são normalmente produzidas no metabolismo oxidativo, quando não neutralizadas podem causar danos a todas as classes de macromoléculas resultando em morte celular. Quando essas moléculas estão em excesso, podem causar um quadro de estresse oxidativo, estado responsável por várias doenças humanas (Berg, Tymoczko e Stryer, 2014). Dentre as defesas antioxidantes existe a GSH (glutathiona reduzida), que é um tripeptídeo com um grupo sulfidril livre, a qual transforma as EROs em formas inócuas e possuem um papel fundamental em mecanismos de detoxificação intracelular. As GSTs (glutathiona S-transferases, E.C. 2.5.1.18) são enzimas detoxificantes do organismo, que pertencem a uma família multifuncional de enzimas que catalisam a conjugação da molécula de GSH à várias outras moléculas tóxicas ao organismo (Berg, Tymoczko e Stryer, 2014). A avaliação da curcumina sobre a modulação das GSTs torna-se importante para entender como o composto atua no sistema de detoxificação no organismo.

Além da formação das EROs em grande quantidade, outro problema de saúde pública é a doença de Alzheimer, a qual é caracterizada como uma neurodegeneração progressiva. Segundo a hipótese colinérgica pode ser originada por uma diminuição nos níveis celulares do neurotransmissor ACh, sendo que os impulsos nervosos transmitidos através das sinapses por pequenas moléculas difusíveis são mediados pelos neurotransmissores. A enzima AChE (E.C. 3.1.1.7), presente na fenda sináptica, hidrolisa a ACh em colina e acetato logo, um aumento na atividade da AChE pode resultar na redução da concentração de ACh (Berg, Tymoczko e Stryer, 2014; Ventura

*et al.*, 2010). Outra enzima colinérgica, a BChE (E.C. 3.1.1.8) é produzida principalmente no fígado para ser liberada na circulação sistêmica e, assim como a AChE parece estar envolvida na doença do Alzheimer. Logo, novos estudos estão sendo realizados na busca por inibidores seletivos das ChE, a fim de aumentar os níveis de ACh nas sinapses cerebrais para transmissão e cognição colinérgica (Bono *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2017; Lockridge, 2015; Pope e Brimijoin, 2018).

Apesar da comprovada eficácia da curcumina em relação a diversas atividades biológicas, a baixa solubilidade diminui sua eficácia terapêutica e biodisponibilidade. Além disso, a baixa biodisponibilidade da curcumina prejudica sua absorção completa (Giuliani, Cerretani e Cichelli, 2016; Gou *et al.*, 2011; Mahmood *et al.*, 2015; Prasad, Tyagi e Aggarwal, 2014). A nanoencapsulação vem sendo utilizada para contornar sua baixa hidrofobicidade e/ou biodisponibilidade (Das, Kasoju e Bora, 2010; Rocha *et al.*, 2014; Silva *et al.*, 2018; Yallapu *et al.*, 2010). Além disso, estudos demonstram que a nanoencapsulação pode aumentar a biodisponibilidade da curcumina, sendo ótima ferramenta para liberação controlada e direcionamento de compostos bioativos (Mozafari *et al.*, 2006; Pisoschi *et al.*, 2018).

Frente ao exposto, a utilização do método de dispersão sólida com o auxílio de ultrassom demonstra ser um método promissor para a nanoencapsulação da curcumina em materiais biodegradáveis, na tentativa de melhorar as propriedades tecnológicas do composto e aumentar sua área de ação e biodisponibilidade.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. OBJETIVO GERAL

Nanoencapsular curcumina utilizando os polímeros poli(etileno glicol ou Poloxamer 407 como encapsulantes e realizar análises enzimáticas *in vitro* a partir de tecidos de *Drosophila melanogaster*.

### 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Produzir nanopartículas de curcumina pela técnica de dispersão sólida;
- Caracterizar as nanopartículas pelas técnicas de: Microscopia Eletrônica de Transmissão, Difração a Laser, Calorimetria Diferencial de Varredura, Espectrofotometria no Infravermelho e Difração de Raios-X;
- Definir as concentrações de nanopartículas de curcumina necessárias para modular as atividades enzimáticas da AChE, BChE e GST em experimentos *in vitro*.
- Analisar em testes *in vitro*, os efeitos da curcumina livre e das nanopartículas de curcumina na atividade das enzimas AChE, BChE e GST presentes em material biológico extraído de *Drosophila melanogaster*.

### 3. REVISÃO DE LITERATURA

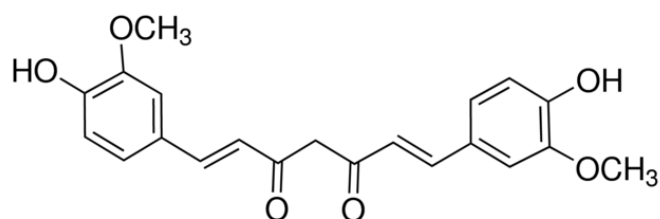
#### 3.1. CURCUMINA

Os compostos bioativos são importantes para a medicina natural e por muitos anos vem sendo utilizados em todo o mundo. Esses bioativos são caracterizados como os compostos que apresentam efeito sobre o organismo, que não são nutrientes e não participam do desenvolvimento das plantas, aparecendo como resultado do seu metabolismo. Dentre os produtos naturais com carácter nutracêutico tem-se a cúrcuma ou açafrão, sendo essa uma fonte de componentes de polifenóis bioativos. O açafrão (*Curcuma longa Linn*) é um membro da família *Zingiberaceae* e é cultivado em regiões tropicais e subtropicais ao redor do mundo. Essa especiaria é amplamente empregada como agente corante e aromatizante na forma de caril (*curry*) e mostarda (Pandit *et al.*, 2011).

A bioatividade da cúrcuma é atribuída aos compostos presentes em sua composição, caracterizados como compostos fenólicos de coloração amarela-alaranjada, sendo os mais abundantes a curcumina, demetoxicurcumina e a bisdemetoxicurcumina (Amalraj *et al.*, 2017). Esses curcuminóides, especialmente a curcumina (Figura 1), têm despertado o interesse de pesquisadores. Atualmente, os órgãos regulamentadores mais importantes já descrevem a utilização desses compostos, bem como a FDA e a ANVISA, considerando que a curcumina não oferece risco a saúde (GRAS), o qual liberam o seu uso diário via oral em cápsulas de 80 até 160 mg e uso como corante de até 3 mg.kg<sup>-1</sup> (FAO, 2006).

A curcumina apresenta propriedades antioxidante (Agarwal, Goel e Behari, 2010), antiinflamatória (Chandran e Goel, 2012; Saranya *et al.*, 2018), anticarcinogênica (Prasad, Tyagi e Aggarwal, 2014), antidepressiva (Xia *et al.*, 2006), antiviral (Rhein, von *et al.*, 2016), neuroprotetora (Prasad e Muralidhara, 2014) e atividade analgésica (Sharma, Sharma e Kohli, 2010). Devido à presença de dois grupos fenólicos e um grupo metileno ativo, pode ser também um quelante do íon ferro (Giuliani, Cerretani e Cichelli, 2016).

Figura 1. Estrutura química da curcumina.



Fonte: Sigma-Aldrich (2018).

A maioria dos estudos em relação à curcumina empregam a via de administração na forma oral (Kawanishi *et al.*, 2013). Por essa via, a curcumina apresentou alguns efeitos biológicos como o de atenuar o estresse oxidativo e aumentar a capacidade antioxidante em humanos (Takahashi *et al.*, 2013). Porém, apesar desses efeitos, vários estudos ainda apontaram uma baixa biodisponibilidade da curcumina em tecidos após a administração oral, sugerindo que a eficácia fora do trato gastrointestinal pode ser limitada (Nelson *et al.*, 2017; Yang *et al.*, 2007). Além disso, alguns metabólitos da curcumina podem ser pró-oxidativos em altas concentrações, demonstrando a importância da utilização de concentrações controladas e que sejam totalmente biodisponíveis (Burgos-Morón *et al.*, 2010).

Sabendo que a curcumina tem baixa absorção, biodistribuição, metabolização, e biodisponibilidade, pesquisas acerca do aumento da biodisponibilidade, melhor permeabilidade e resistência do processo metabólico tem indicado bons resultados para formulações de curcumina encapsulada na forma de nanopartículas (Rocha *et al.*, 2014; Silva *et al.*, 2018; Silva-Buzanello *et al.*, 2016).

### 3.2. TÉCNICAS DE ENCAPSULAÇÃO

As técnicas de nanoencapsulação para compostos bioativos e nutracêuticos incluem as nanoemulsões, nanossuspensões, lipossomas, nanopartículas lipídicas sólidas, nanoencapsulação em polímeros e micelas feitas de proteínas e polissacarídeos. Na indústria alimentícia, a encapsulação de corantes e bioativos torna-se importante devido a sua melhor solubilização e proteção contra processos de oxidação, objetivando o aumento da vida de prateleira dos alimentos (Akhavan e Jafari, 2017; Jafari, 2017).



Algumas técnicas chegam a melhorar de forma acentuada a biodisponibilidade da curcumina no organismo humano (Shoba *et al.*, 1998). Atualmente, a micro e nanoencapsulação são utilizadas com bastante êxito para contornar essa baixa solubilidade em água e biodisponibilidade do composto (Das, Kasoju e Bora, 2010; Rocha *et al.*, 2014; Silva *et al.*, 2018; Yallapu *et al.*, 2010). A utilização da encapsulação já é uma realidade, entretanto, busca-se alternativas e aplicações na indústria de alimentos para produzir alimentos mais nutritivos ou com maior vida de prateleira.

A nanoencapsulação permite que substâncias sejam acondicionadas em estruturas de nanoescala (Barbosa *et al.*, 2017; Sá *et al.*, 2016), que pode melhorar o valor nutricional do alimento e seus atributos sensoriais aumentando assim o valor agregado com menor custo (Ezhilarasi *et al.*, 2013; Sekton, 2010). A eficácia da entrega é influenciada pelo tamanho das partículas, pois aumenta a área de superfície, melhorando a absorção (Hughes, 2005; Pisoschi *et al.*, 2018). Estudos demonstram que a nanoencapsulação é melhor que a microencapsulação para obtenção de melhor bioatividade e ótima ferramenta para liberação controlada e direcionamento dos compostos bioativos (Mozafari *et al.*, 2006; Pisoschi *et al.*, 2018).

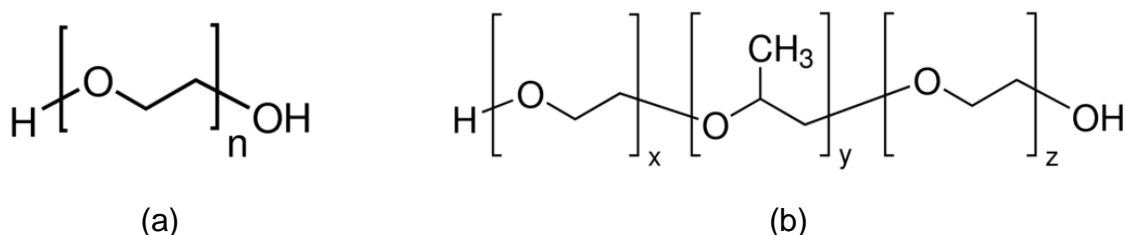
Dentre as metodologias utilizadas na nanoencapsulação de compostos bioativos, destaca-se a técnica de dispersão sólida. O conceito da dispersão sólida foi primeiro proposto por Sekiguchi e Obi (1961) e consiste na dispersão de um ou mais compostos em uma matriz transportadora inerte. Esse método demonstra uma melhora na dissolução de compostos e aumento da biodisponibilidade (Baghel, Cathcart e O'Reilly, 2016; Chaudhari e Dugar, 2017). Existem ferramentas que auxiliam na agilidade e eficiência da técnica, como o ultrassom. O uso da sonicação é considerado como um método mecânico que utiliza alto cisalhamento, cavitação acústica e turbulência acelerando o processo de micro ou nanoencapsulação (Galindo-Pérez *et al.*, 2018; Iqbal *et al.*, 2015).

O perfil de dissolução do método de dispersão sólida é governado pelas propriedades da matriz e sua concentração utilizada na formulação, além da adição de surfactantes. Esses, por sua vez, reduzem a barreira de energia interfacial entre o composto e o meio de dissolução aumentando a molhabilidade. A utilização de polímeros surfactantes acima da CMC melhora a solubilidade do composto devido à formação de micelas (Tadros, 2005).

### 3.2.1. Matrizes Poliméricas

Um polímero é definido como uma molécula formada por várias unidades estruturais (monômeros) que se repetem formando uma cadeia polimérica. Estes são classificados de acordo com a sua origem como naturais, semi-sintéticos ou sintéticos. Também podem ser classificados como homopolímeros ou copolímeros (Kadajji e Betageri, 2011) e como amorfos, semicristalinos ou cristalinos. Isso é de grande importância no processo de encapsulação, pois as suas complexas estruturas tridimensionais com numerosas ligações e com a incorporação de bioativos amorfos dificultam a sua mobilidade molecular (Donnelly *et al.*, 2015). Logo, os polímeros evitam a desvitrificação, preservando a viabilidade (solubilidade e estabilidade) do estado amorfo durante a vida útil do composto (Kawakami, 2015). Dentre os polímeros utilizados como excipientes, apresenta-se o poli(etileno glicol) (PEG) (Figura 2b) e o polímero surfactante Poloxamer 407 (Figura 2a). O PEG é aplicado como veículo em formas farmacêuticas orais (Gullapalli, 2010), o seu estado físico e a sua aplicabilidade podem variar com a sua massa molar, pois o composto pode alternar da forma líquida para sólida dependendo do tamanho das suas cadeias. Os grupos funcionais presentes nesse polímero fazem ligações com compostos apolares e o grupamento hidroxila terminal faz com que a solubilidade em água desses compostos aumente (Gullapalli e Mazzitelli, 2015).

Figura 2. Estruturas químicas do (a) poli(etileno glicol) (PEG) e (b) Poloxamer 407.



Fonte: Fonte: Sigma-Aldrich (2018b; c)

O Poloxamer 407 é um surfactante polimérico que é comumente usado na indústria farmacêutica para encapsulação de fármacos e consiste em um copolímero de bloco A-B-A, onde A é a cadeia hidrofílica (poli (óxido etileno)) e B a cadeia hidrofóbica (poli(óxido propileno)) (Tadros, 2005). A cadeia hidrofóbica de micelas formadas serve como um espaço de cargas para a incorporação de compostos

lipofílicos, como a curcumina, enquanto que a parte hidrofílica contribui para o comportamento farmacêutico dessas formulações, diminuindo as interações medicamentosas indesejáveis com células e proteínas, mantendo a estabilidade (Kabanov, Batrakova e Alakhov, 2002). Portanto, a incorporação de drogas no núcleo hidrofóbico dos blocos de Poloxamer 407 resulta em um aumento da solubilidade, da estabilidade metabólica, da biodisponibilidade e do tempo de circulação (Ali, Williams e Rawlinson, 2010; Boonlai *et al.*, 2017; Eloy e Marchetti, 2014; Kuroiwa *et al.*, 2018; Sahu *et al.*, 2011).

### 3.3. ATIVIDADE ENZIMÁTICA

As enzimas são majoritariamente proteínas que catalisam reações bioquímicas, com importante ação na prevenção de doenças e na regularização do organismo. Possuem, a característica catalítica altamente efetiva para diversos tipos de reações por meio de seu sítio ativo, local onde ocorre a ligação com o substrato e/ou a catálise. Por isso, para determinar a capacidade antioxidante ou neuroprotetora de um composto contido em um alimento ou de um composto isolado é importante realizar análises enzimáticas (Altinkaynak *et al.*, 2016; Jia, Narasimhan e Mallapragada, 2014).

As enzimas são classificadas pelo tipo de reação que catalisam e são separadas por classes (número), logo, as oxirredutases são responsáveis pela transferência de elétrons, as transferases atuam na transferência de grupos, as hidrolases catalisam reações de quebra de ligação na presença de água, as liases clivam ligações e rompem ligações duplas ou anéis, as isomerases são responsáveis pela transferência de grupos dentro da mesma molécula o que resulta em formas isoméricas e as ligases atuam na formação de algumas ligações (Berg, Tymoczko e Stryer, 2014).

A alta atividade de algumas enzimas ou a deficiência de compostos antioxidantes podem estar associados às doenças neurodegenerativas, como a doença de Alzheimer e o mal de Parkinson. As colinesterases (ChE) são responsáveis pelas hidrólises do neurotransmissor acetilcolina (ACh) que é liberado durante a transmissão colinérgica pelos neurônios. Logo, as enzimas acetilcolinesterase (AChE) e butirilcolinesterase (BChE) mostraram estarem envolvidas no mecanismo de

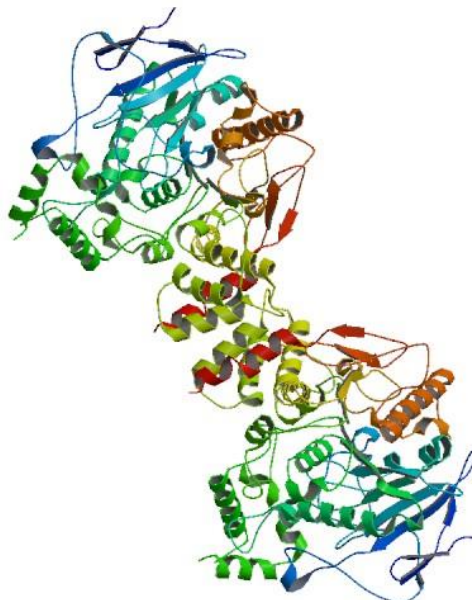
desencadeamento da doença de Alzheimer (Hamaguchi, Ono e Yamada, 2010; Pohanka, 2011).

### 3.3.1. Sistema Colinérgico

A família das colinesterases são enzimas que hidrolisam o neurotransmissor ACh em acetato e colina na fenda sináptica presentes em várias partes do corpo humano. Quando um impulso nervoso chega a um neurônio faz com que aproximadamente 300 moléculas de ACh sejam liberadas na fenda sináptica, isso causa a abertura de um canal catiônico chamado receptor de acetilcolina (Berg, Tymoczko e Stryer, 2014).

A AChE (Figura 3) é uma enzima acetilcolina hidrolase com atividade de esterase e está presente nas sinapses colinérgicas e junções neuromusculares em vertebrados e invertebrados. Localiza-se principalmente no lacunas sinápticas do sistema nervoso central (SNC) e periférico (SNP) (Kim e Lee, 2018; Pope e Brimijoin, 2018).

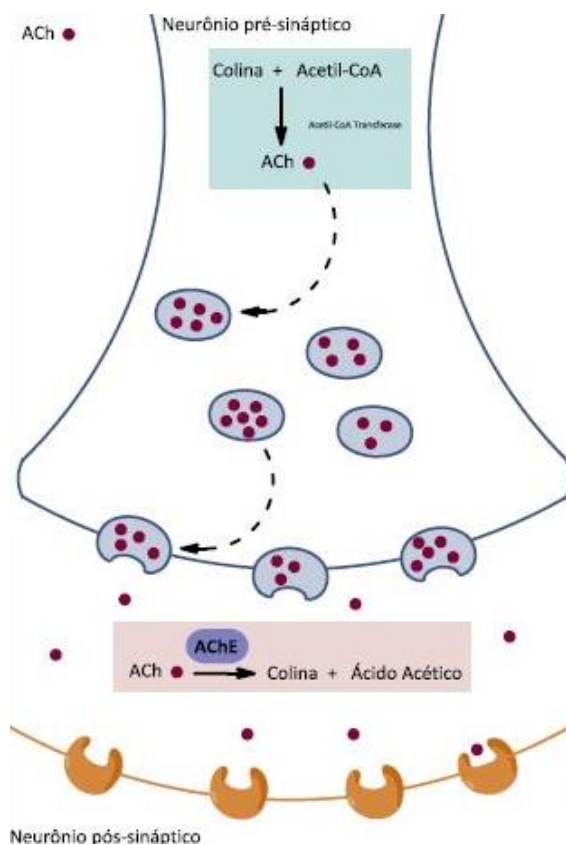
Figura 3. Estrutura tridimensional da AChE de *Drosophila melanogaster*.



Fonte: PDB (2015).

O neurotransmissor ACh é sintetizado no neurônio pré-sináptico sob a ação da enzima acetiltransferase (E.C. 2.3.1.6) que utiliza a colina e acetilcoenzima A como substratos (Figura 4). Quando há um estímulo elétrico o neurônio libera as ACh na fenda sináptica para que seja posteriormente adsorvida pelo receptor do neurônio pós-sináptico, transmitindo a informação (Berg, Tymoczko e Stryer, 2014). A alta atividade da AChE presente na fenda sináptica causa a hidrólise desses neurotransmissores antes que a informação seja transmitida. Logo, a melhoria na transmissão colinérgica e inibição das enzimas ChE tem sido sugerido na prevenção do envelhecimento e da demência (M. Araújo, L. A. Santos e A. Gonsalves, 2016).

Figura 4. Atividade da AChE na sinapse colinérgica.



Fonte: Araújo, Santos e Gonsalves (2016).

A enzima BChE é produzida principalmente no fígado para ser liberada na circulação sistêmica. Essa enzima também pode ser produzida em menor escala no cérebro, onde apesar de ter seu substrato original (butirilcolina), também está envolvida na hidrólise de ACh, portanto não sendo específica para um substrato. Acreditou-se por certo tempo que essa enzima não possuía função específica, mesmo

que mais distribuída no organismo que a AChE, servia apenas como enzima substituta (Li *et al.*, 2017; Lockridge, 2015). Atualmente, considera-se que a BChE tem propriedade de hidrolisar ésteres bioativos, essa característica torna possível ao ser humano obter nutrientes das plantas, pois uma falha na hidrólise de alguns ésteres endógenos poderia torná-lo tóxico ao organismo (Pope e Brimijoin, 2018).

Acredita-se que a BChE também pode estar envolvida na doença do Alzheimer. Estudos foram realizados na busca por inibidores seletivos de BChE, a fim de aumentar os níveis de ACh nas sinapses cerebrais para transmissão e cognição colinérgica. Por mais que os efeitos dos inibidores tenham sido positivos melhorando a função cognitiva e aumentando a memória em curto prazo, os efeitos foram temporários, apresentando um melhor efeito no início da doença, mas sem cura. Além disso, alguns apresentaram certa toxicidade ao organismo humano bem como muitos efeitos colaterais (Bono *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2017; Lockridge, 2015; Pope e Brimijoin, 2018).

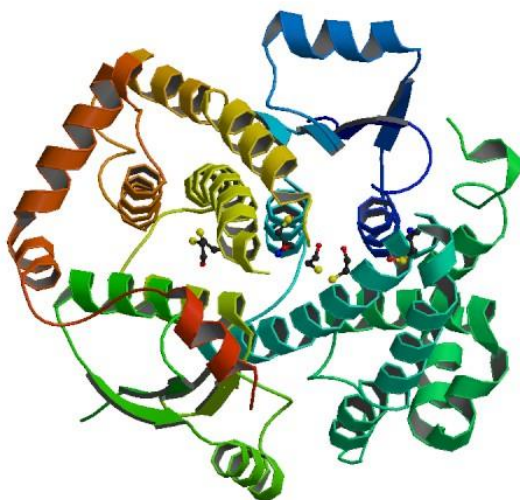
### 3.3.2. Estresse Oxidativo

As glutathione S-transferases (GSTs, Figura 5) são enzimas que estão envolvidas na detoxificação de toxinas químicas presentes no organismo, como as espécies reativas de oxigênio (EROs). Pertencentes a uma superfamília de proteínas detoxificantes, essa enzima catalisa a conjugação da molécula glutathione a esses xenobióticos. As EROs normalmente produzidas no metabolismo oxidativo podem causar danos a todas as classes de macromoléculas presentes no organismo humano, que podem levar à morte celular. Além disso, essas espécies estão envolvidas em diversas doenças humanas (Atkinson e Babbitt, 2009; Berg, Tymoczko e Stryer, 2014; Board e Menon, 2013; Zhang *et al.*, 2014).

A GSH é um tripeptídeo com um grupo sulfidril livre e um derivado altamente distinto de aminoácido, que desempenha várias funções nos organismos vivos. Atuam como tampão de sulfidrilas e tem importantes ações no combate ao estresse oxidativo pois reduzem as EROs a formas inócuas, essa ação pode ser catalisada pela enzima GST. Uma vez cumprida sua tarefa, a glutathione retorna a forma oxidada (GSSG) e precisa ser reduzida para regenerar GSH (Berg, Tymoczko e Stryer, 2014).

Além do estresse oxidativo, a redução da GSH pode causar neurodegeneração no caso da redução acentuada nos níveis de GSH no cérebro, especificamente na substância *nigra pars compacta* (SNpc). Isso é considerado o primeiro passo para desencadear a neurodegeneração, que precede o estresse oxidativo e o mal de Parkinson. Portanto, a restauração dos níveis de GSH celular pode impedir o início dessa doença (Harish *et al.*, 2010).

Figura 5. Estrutura tridimensional da GST de *Drosophila melanogaster*.



Fonte: PDB (2004).

### 3.4. SISTEMA BIOLÓGICO

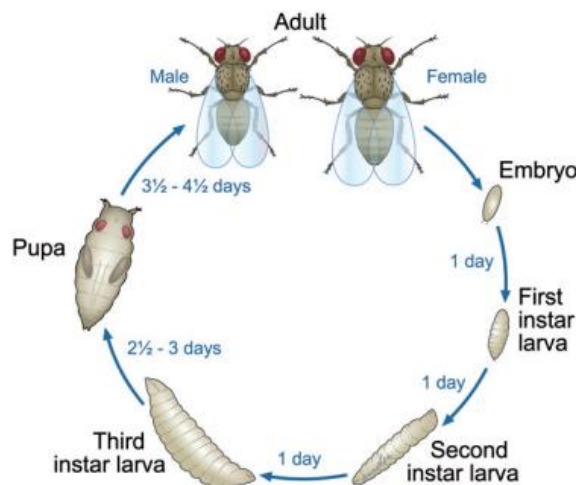
A maioria das análises laboratoriais geralmente utilizam animais para a realização de análises *in vitro*, *in vivo* e *ex vivo*. Essas análises mimetizam modelos de doenças humanas para serem posteriormente tratadas com compostos bioativos ou até mesmo analisadas a ação preventiva deles. No caso de animais vertebrados como ratos e camundongos, existem leis rigorosamente exigidas para criação, tratamento e manipulação em pesquisa, como a Lei nº 11.794/2008 (Brasil, 2008). Como modelos biológicos alternativos, animais invertebrados podem ser utilizados como é o caso da mosca-da-fruta do tipo *Drosophila melanogaster* (Bellen, Tong e Tsuda, 2010; O’Kane, 2011; Prüßing, Voigt e Schulz, 2013).

Estima-se que 75% dos genes das *Drosophila melanogaster* podem estar relacionadas com doenças humanas, fazendo que esse invertebrado reproduza

modelos de doenças como Alzheimer, mal de Parkinson ou que envolvam mecanismos de estresse oxidativo e neurodegeneração. Além disso, a sua reprodução produz centenas de descendentes dentro de 10 a 12 dias sob condições ideais (25°C e 60% umidade) (Prüßing, Voigt e Schulz, 2013).

O organismo das *Drosophila melanogaster* na sua fase adulta é composto por um sistema muito sofisticado, com estruturas que desempenham papéis homólogos a órgãos humanos, como coração, pulmão e sistema nervoso central. O sistema cerebral, com mais de 100.000 neurônios, pode ter variadas funções como aprendizado, alimentação e memória. Além disso, essas moscas possuem um ciclo de vida (Figura 6) curto, permitindo a realização de pesquisas em várias gerações em pequeno espaço de tempo (Bellen, Tong e Tsuda, 2010; O’Kane, 2011).

Figura 6. Ciclo de vida das *Drosophila melanogaster*.



Fonte: Ong *et al.*, (2015)

Atualmente, as *Drosophila melanogaster* tem sido utilizada como modelo animal alternativo e complementar na triagem de agentes terapêuticos naturais para o tratamento de doenças neurodegenerativas. De fato, o uso dessas moscas é recomendado pelo ECVAM na promoção da redução do uso de animais de laboratório em estudos de toxicidade (Apidianakis e Rahme, 2011; Hirth, 2010; Hurd *et al.*, 2013; Jennings, 2011; Pandey e Nichols, 2011; Prüßing, Voigt e Schulz, 2013; Robinson *et al.*, 2013; Stephenson e Metcalfe, 2013).

Em estudos com *Drosophila melanogaster*, a curcumina livre já foi relatada em prolongar o tempo de vida desses insetos, melhorar o estado de saúde e exercer



propriedades anti-envelhecimento (Shen *et al.*, 2013). Entretanto, ainda não foi abordado o efeito da curcumina de nanoencapsuladas na modulação enzimática e na toxicidade, aumentando o interesse e a importância de estudos sobre a atividade das nanopartículas de curcumina nesse meio.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1. MATERIAIS

Os polímeros poli(etileno glicol) (PEG, massa molar de 6.000 g/gmol, Sigma-Aldrich) e Kolliphor® Poloxamer 407 (massa molar de 12.000 g/gmol, Sigma-Aldrich), e os compostos curcumina (99,5%, Sigma-Aldrich), álcool etílico (Vetec, 99,5%), acetona (Neon, 99,8%) e o surfactante Tween 80 P.S. (Dinâmica) foram utilizados na obtenção das nanopartículas. Brometo de potássio foi utilizado nas análises de Espectroscopia de Infravermelho. Para as análises enzimática da AChE e BChE foram utilizados Tris-HCl (Dinâmica), DTNB (Sigma-Aldrich) iodeto de acetiltiocolina e S-butiriltiocolina (Sigma-Aldrich), enquanto que para as análises de GST foram utilizados o fosfato de potássio monobásico e dibásico (Dinâmica), CDNB (Sigma-Aldrich) e o substrato glutationa reduzida (Sigma-Aldrich) . Para determinação do teor proteico foi utilizado o ácido ortofosfórico (ORTO, Dinâmica, 85% PA) e azul brilhante comassie (Sigma-Aldrich). Por final, foi utilizado DMSO (Dinâmica, PA) para solubilização da curcumina para análises biológicas.

### 4.2. OBTENÇÃO DE NANOPARTÍCULAS PEG-CURCUMINA

As nanopartículas foram obtidas pela técnica de dispersão sólida descritas previamente por Almeida *et al.* (2017), com algumas modificações. Poli(etileno glicol) (3,60 g) e Tween 80 (0,36 g) foram solubilizadas em etanol (130 mL) com auxílio de agitação magnética à 45°C durante 5 minutos. Separadamente, curcumina (0,36 g) foi solubilizada em etanol (20 mL) por cinco minutos. Ambas as soluções foram misturadas e submetidas à sonicação (Fisher Scientific, 120 W, ponteira de 1/8" de diâmetro) por 3 minutos a 45°C (pulsos de 30 segundos e 10 segundos de pausa). Levou-se a dispersão obtida para evaporação em estufa com circulação e renovação de ar a 50°C, por aproximadamente 12 horas. As amostras foram então armazenadas a 10°C protegidas da luz.

#### 4.3. SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS DE P407-CURCUMINA

As nanopartículas foram obtidas pela técnica de dispersão sólida descrita previamente por Serajuddin (1999), com algumas modificações. Poloxamer 407 (3,600g) e Tween 80 P.S. (0,360g) foram solubilizadas em acetona (36 mL) com auxílio de agitação magnética a 25°C durante 5 minutos. Posteriormente, a curcumina (0,360g) foi adicionada à solução e agitou-se por 1 minuto. O meio foi vertido rapidamente em um tubo cônico tipo Falcon (50 mL), e então a mistura foi submetida à sonicação (Fisher Scientific, 120 W, ponteira de 1/8" de diâmetro) por 3 minutos a 45°C (pulsos de 30 segundos e 10 segundos de pausa). Levou-se a dispersão obtida para evaporação em estufa com circulação e renovação de ar a 50°C, por aproximadamente 12 horas. As amostras foram então armazenadas a 10°C protegidas da luz até a caracterização.

#### 4.4. CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS

A caracterização morfológica das nanopartículas foi feita utilizando Microscopia de Transmissão Eletrônica (TEM; JEOL modelo JEM 2100, 200 kV). Amostras diluídas foram gotejadas em suportes de cobre de 300 *mesh* cobertas de parlódio e secas em temperatura ambiente. A difração a laser (Malvern Mastersizer 3000) foi utilizada para determinar a distribuição do tamanho de partículas utilizando água como dispersante. As nanopartículas ou curcumina (10 mg e 1 mg, respectivamente) foram dispersas em água (10 mL) sob agitação por 5 minutos para avaliar a capacidade de dispersão em água.

Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC, Perkin Elmer 4000) foi empregada para avaliar o estado físico da curcumina e das nanopartículas. Cerca de 5 a 10 mg do analito foram alocadas em porta-amostras de alumínio fechadas e aquecidas de 0 a 300°C com taxa de 20°C.min<sup>-1</sup> e fluxo de nitrogênio de 50 mL.min<sup>-1</sup>. Análises de Espectroscopia no Infravermelho por Transformação de Fourier (FTIR, Shimadzu-IRAffinity-1) foram realizadas para observar a existência de possíveis interações químicas entre os reagentes utilizados no processo da produção de nanopartículas de curcumina. Para as análises utilizou-se cerca de 3 mg de composto para produção de pastilhas de brometo de potássio (100 mg). Foram então analisadas com resolução

de 2  $\text{cm}^{-1}$  entre 4750 e 450  $\text{cm}^{-1}$  com 32 *scans* cumulativos. Os picos foram normalizados para possibilitar a comparação entre as amostras. Os padrões de Difração de Raios-X foram adquiridos utilizando um equipamento Bruker a 1,1 kVA e 5,9°.min<sup>-1</sup> de 2 a 60°.

Em alguns casos, uma mistura física entre a curcumina e os encapsulantes foi obtida pela simples mistura manual desses componentes em cadinho para comparação com as nanopartículas.

#### 4.5. ANÁLISES BIOLÓGICAS (*in vitro*)

Todos os experimentos foram realizados em duplicata com no mínimo quatro repetições, obtendo uma curva de concentração preliminar para determinar qual a melhor a ser utilizada para as análises enzimáticas. Foi utilizada a curcumina na forma livre para realizar comparações com a forma encapsulada sobre a ação das enzimas, bem como os veículos (água e DMSO) e os encapsulantes na forma pura.

##### 4.5.1. Preparação do Homogeneizado

Cerca de 100 moscas por grupo foram imobilizadas em gelo por aproximadamente 30 minutos e depois manualmente homogeneizadas com auxílio de um bastão de vidro em tampão Tris-HCl 0,5 M e pH 7,4 na proporção de 1:10 (mosca/volume (em  $\mu\text{L}$ )). O homogeneizado obtido das moscas foi centrifugado a 12.000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante (S1) foi removido e utilizado para análises.

##### 4.5.2. Atividade da AChE

A atividade da AChE foi determinada de acordo com o método de Ellman (1959) com modificações. O meio da reação continha 100  $\mu\text{L}$  de tampão Tris-HCl 0,5 M (pH 7,4), 100  $\mu\text{L}$  de 5,5'-Dithiobis (ácido 2-nitrobenzóico) (DTNB) 10 mM e 75  $\mu\text{L}$  de S1. As amostras foram pré-incubadas com 25  $\mu\text{L}$  da NPs de curcumina (nas concentrações finais de 0 a 100  $\mu\text{M}$  ou até inibição significativa) ou curcumina livre ou P407 (31  $\mu\text{M}$ ) ou PEG (184  $\mu\text{M}$ ) por 2 minutos e no final foi adicionado 100  $\mu\text{L}$  do

substrato (iodeto de acetiltiocolina 8 mM). A leitura foi realizada em 412 nm a cada 30 segundos durante 3 minutos em espectrofotômetro UV-Vis (OceanOptics modelo USB650). Para completar o volume final de 1000  $\mu$ L foi utilizado água destilada. A atividade enzimática foi expressa em porcentagem (%) em relação ao controle.

#### 4.5.3. Atividade da BChE

A atividade da BChE foi determinada segundo o método de Ellman (1959) com algumas alterações. O meio da reação continha 100  $\mu$ L de tampão Tris-HCl 0,5 M (pH 7,4), 100  $\mu$ L de DTNB 10 mM, 75  $\mu$ L do S1 e 25  $\mu$ L de NPs de curcumina (nas concentrações finais de 0 a 100  $\mu$ M ou até inibição significativa) ou curcumina livre ou P407 (31  $\mu$ M) ou PEG (184  $\mu$ M). As amostras foram incubadas por 2 minutos e no final foi adicionado 100  $\mu$ L do substrato (butiriltiocolina 8 mM), por final o volume de 1000  $\mu$ L foi completado com água destilada. A leitura foi realizada em 412 nm a cada 30 segundos durante 3 minutos em espectrofotômetro UV-Vis (OceanOptics modelo USB650). A atividade enzimática foi expressa em porcentagem (%) em relação ao controle.

#### 4.5.4. Atividade da GST

A atividade da GST foi determinada segundo o método de Habig, Pabst e Jakob (1974) com algumas alterações. Os ensaios contendo 400  $\mu$ L de tampão TFK 40 mM, pH 7,5, 520  $\mu$ L de água destilada, 10  $\mu$ L de NPs (nas concentrações finais de 0 a 100 $\mu$ M ou até inibição significativa) ou curcumina livre ou P407 (31  $\mu$ M) ou PEG (184  $\mu$ M) e 50  $\mu$ L de S1 foram pré-incubados por 2 minutos. Após a incubação, foi adicionado 10  $\mu$ L de glutathiona reduzida 100 mM e 10  $\mu$ L de CDNB (1-cloro-2,4-dinitrobenzeno) 100 mM. A leitura foi realizada em 340 nm a cada 30 segundos por 2 minutos em espectrofotômetro UV-Vis (OceanOptics modelo USB650). A atividade enzimática foi expressa em porcentagem (%) em relação ao controle.

#### 4.5.5. Determinação de Proteína

A concentração de proteína foi determinada pelo método de Bradford (1976). O meio foi constituído por 50 µL do S1 utilizado nas análises enzimáticas acrescidos de 2500 µL do reagente Comassie e a leitura foi em espectrofotômetro UV-Vis (OceanOptics modelo USB650) em 595 nm após 10 minutos de incubação. O fator de correção foi determinado usando uma curva experimental da albumina de soro bovino como padrão. Os resultados foram utilizados no cálculo de atividade enzimática, posteriormente convertidos em porcentagem da atividade.

#### 4.5.6. Análise Estatística

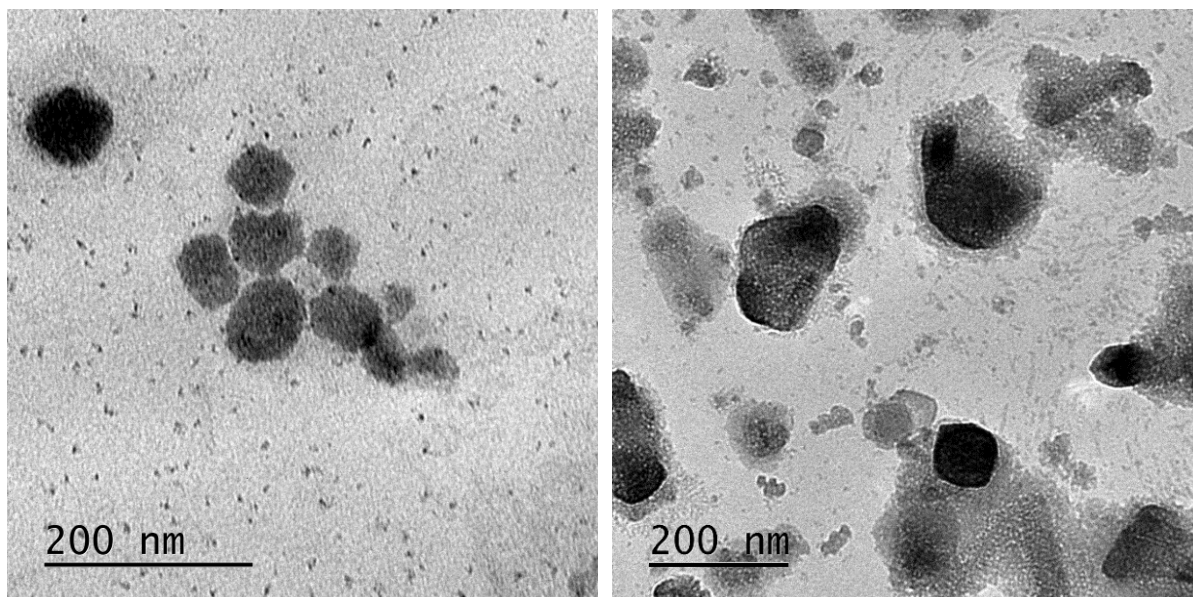
As análises estatísticas foram realizadas pelo software GraphPad Prism 6 utilizando ANOVA de uma via seguido do teste *post hoc* de Tukey à um nível de significância de 0,05.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS

A Figura 7 apresenta imagens de Microscopia Eletrônica de Transmissão das nanopartículas obtidas com PEG e P407 como encapsulantes. Na Figura 8 estão apresentadas as distribuições de tamanhos das partículas para os dois encapsulantes avaliados. As dispersões em água da curcumina e das nanopartículas são apresentadas na Figura 9 (ambas contendo  $0,1 \text{ mg.mL}^{-1}$  de curcumina).

Figura 7. Micrografias das nanopartículas obtidas por Microscopia Eletrônica de Transmissão.

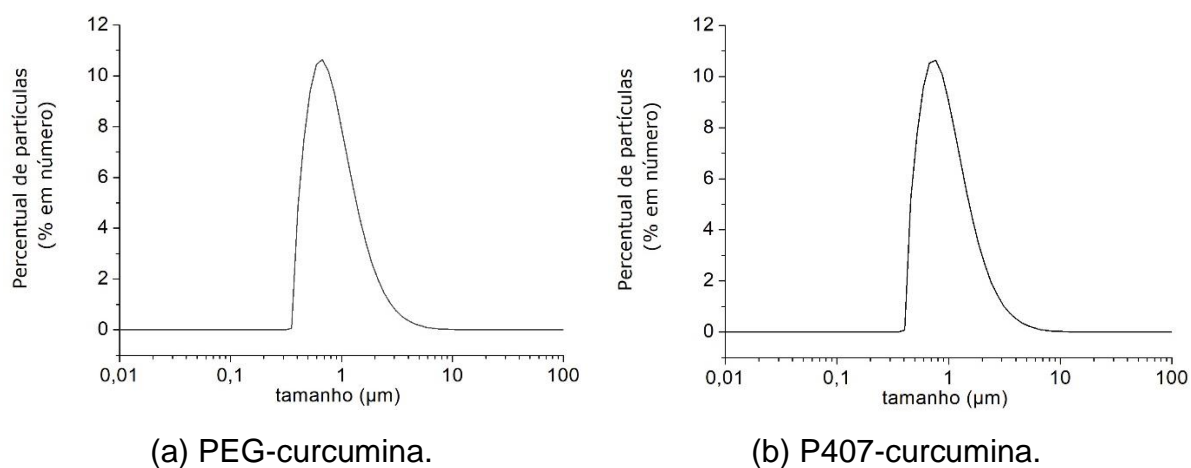


(a) PEG-curcumina.

(b) P407-curcumina.

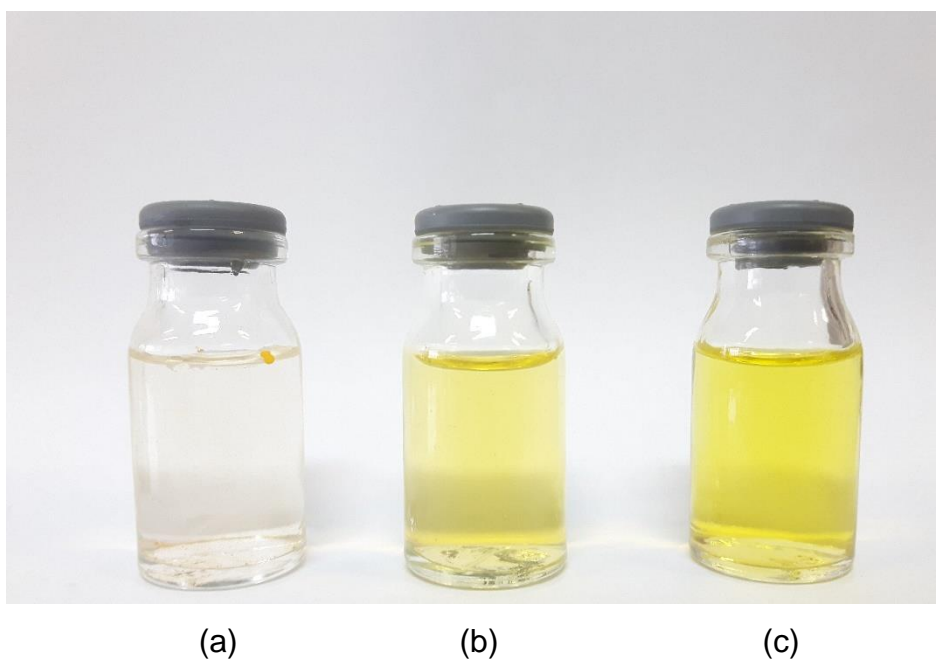
Fonte: Autoria Própria.

Figura 8. Distribuição dos tamanhos das nanopartículas determinados por difração de laser.



Fonte: Autoria Própria.

Figura 9. Dispersões aquosas de curcumina pura (esquerda), nanopartículas PEG-curcumina (centro) e nanopartículas P407-curcumina (direita).



Fonte: Autoria Própria.

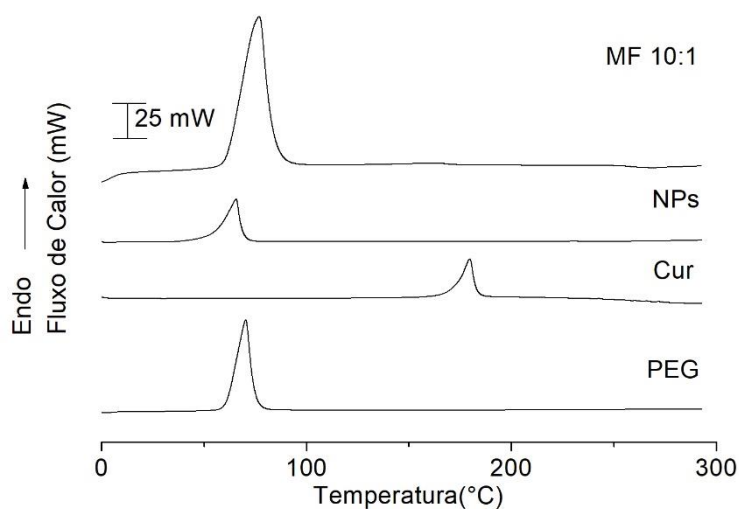
As micrografias indicam que foram produzidas nanopartículas de formatos irregulares em ambos os casos. As nanopartículas de curcumina puderam ser prontamente dispersas em água, demonstrando um aumento na afinidade da água quando comparada com a alta hidrofobicidade da curcumina pura. A amostra



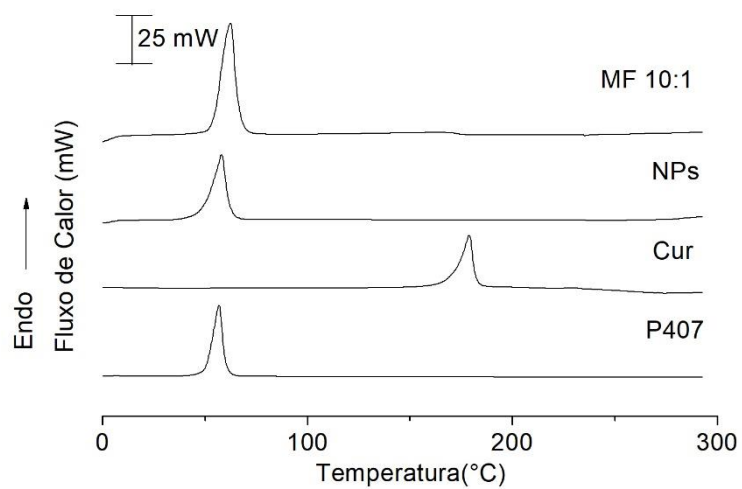
contendo Poloxamer 407 foi a que gerou coloração mais intensa, sugerindo uma melhor capacidade de dispersão nesse meio. Na dispersão da curcumina pura é possível visualizar grumos e pouca afinidade pela água, o que era esperado devido a sua característica hidrofóbica. 50% das nanopartículas apresentaram diâmetros menores que  $0,937 \pm 0,010 \mu\text{m}$  para ambos os casos. Esses valores estão de acordo com a literatura (Almeida, de *et al.*, 2018; Kaminaga *et al.*, 2003).

A Figura 10 apresenta os termogramas de Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC) para (a) as nanopartículas PEG-curcumina e (b) as nanopartículas P407-curcumina (nesses gráficos foram incluídas as misturas físicas (MFs) produzidas na mesma proporção de encapsulante e curcumina encontrada nas nanopartículas, 10:1 m:m). A Figura 11 apresenta os termogramas de Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC) das misturas físicas MFs em diferentes proporções mássicas para (a) PEG e curcumina e (b) para P407 e curcumina.

Figura 10. Termogramas das nanopartículas (a) PEG-curcumina  
(b) P407-curcumina.



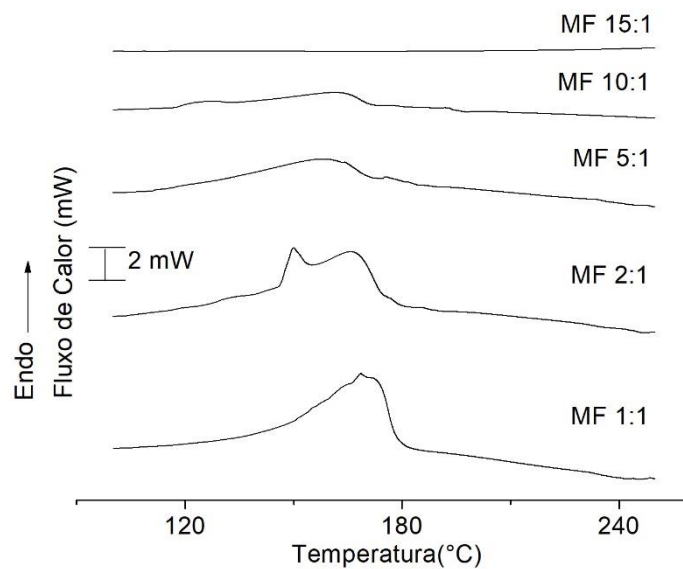
(a) PEG-curcumina.



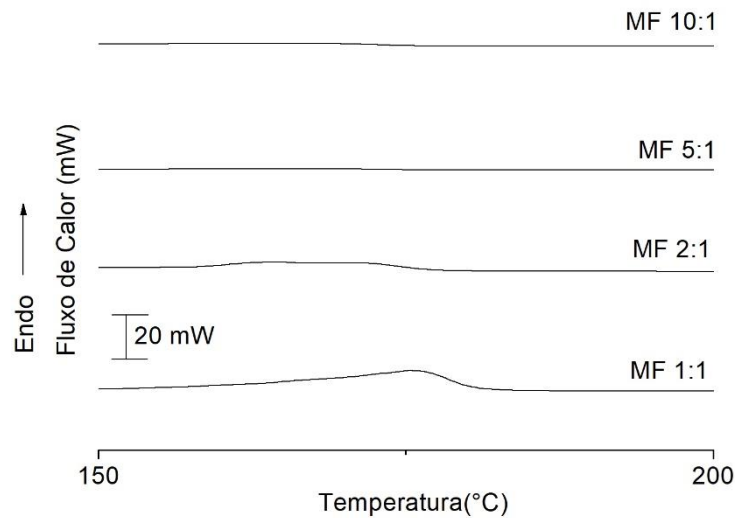
(b) P407-curcumina.

Fonte: Autoria Própria.

Figura 11. Termogramas das misturas físicas (a) PEG e curcumina e (b) P407 e curcumina.



(a) PEG-curcumina.



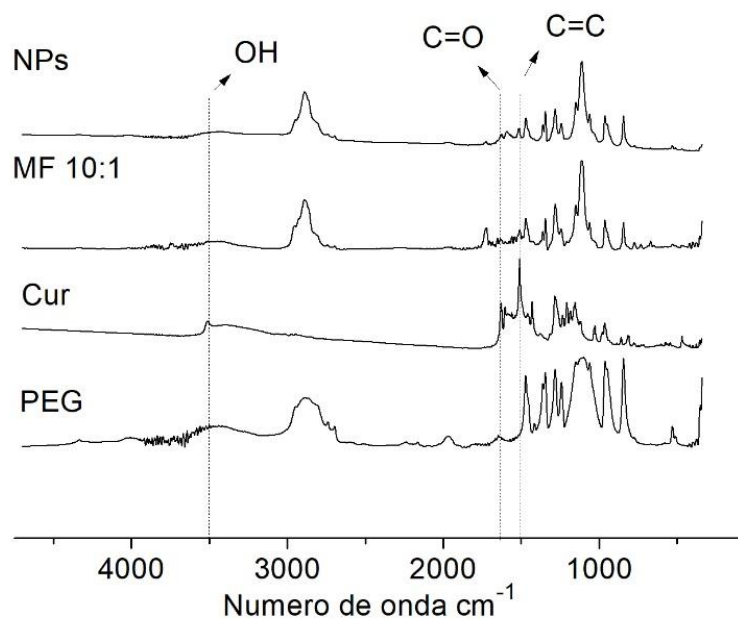
(b) P407-curcumina.

Fonte: Autoria Própria.

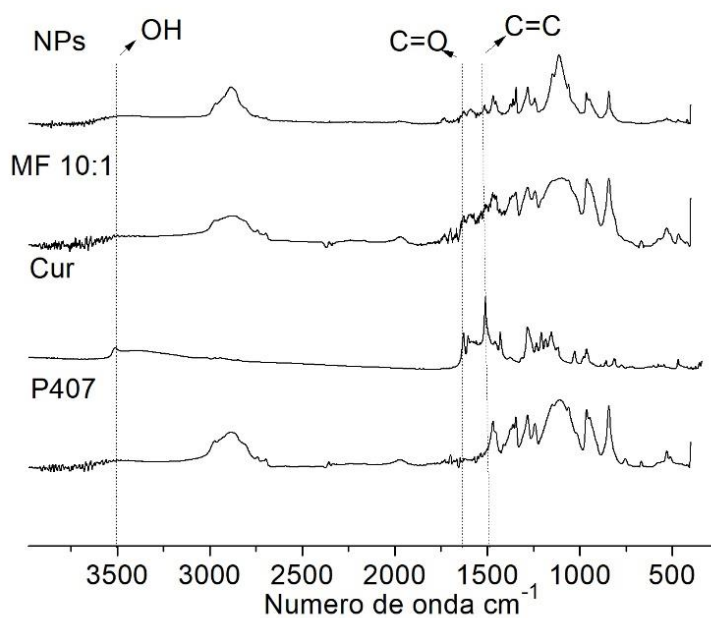
Os picos de fusão do PEG e do P407 foram encontrados em cerca de 70,4°C e 56,8 °C, respectivamente. Nos termogramas é possível identificar o pico de fusão da curcumina em cerca de 170,0 °C, que também foi encontrado na mistura física de forma atenuada devido à baixa concentração de curcumina na amostra. O pico de fusão da curcumina apareceu com intensidade crescente quando a proporção de curcumina na mistura física foi aumentada. Contudo, o pico de fusão da curcumina não apareceu nas nanopartículas, sugerindo a sua conversão do estado físico cristalino para o amorfo (Rocha *et al.*, 2014; Yallapu, Jaggi e Chauhan, 2010).

A Figura 12 apresenta os espectros de infravermelho (FTIR) para (a) as nanopartículas PEG-curcumina e (b) as nanopartículas P407-curcumina (nesses gráficos foram incluídas as misturas físicas (MF) produzidas na mesma proporção de encapsulante e curcumina encontrada nas nanopartículas, 10:1 m:m). A Figura 13 apresenta espectros FTIR das misturas físicas (MFs) em diferentes proporções mássicas para (a) PEG e curcumina e (b) para P407 e curcumina. A Figura 14 apresenta os padrões de difração de Raios-X (a) das nanopartículas PEG-curcumina e (b) das nanopartículas P407-curcumina.

Figura 12. Espectros de FTIR das nanopartículas de (a) PEG-curcumina e (b) P407-curcumina.



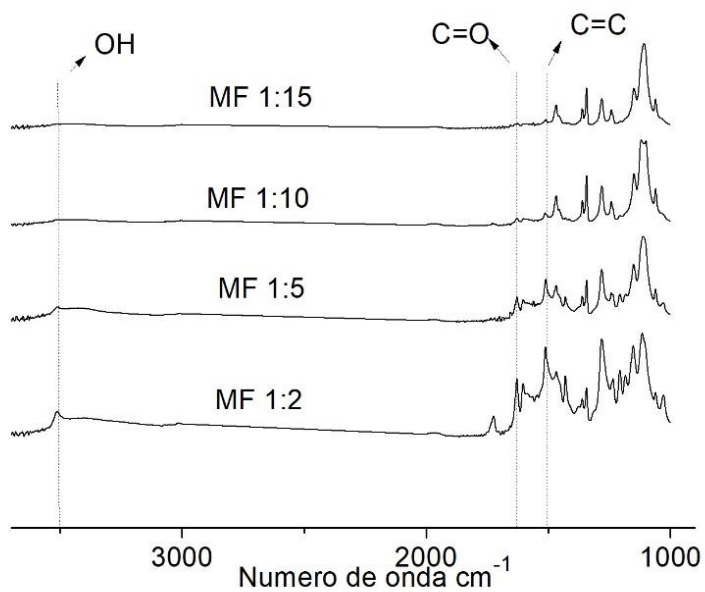
(a) PEG-curcumina.



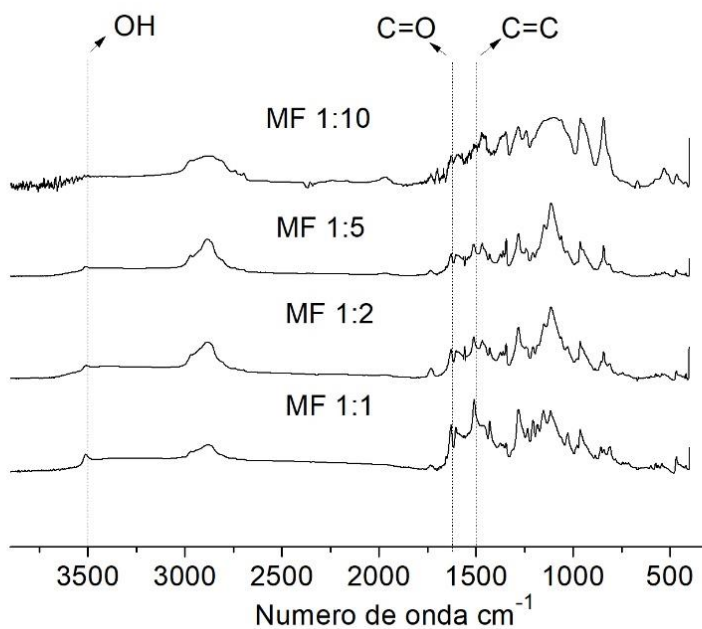
(b) P407-curcumina.

Fonte: Aatoria Própria.

Figura 13. Espectros de FTIR das misturas físicas de (a) PEG-curcumina e (b) P407-curcumina.



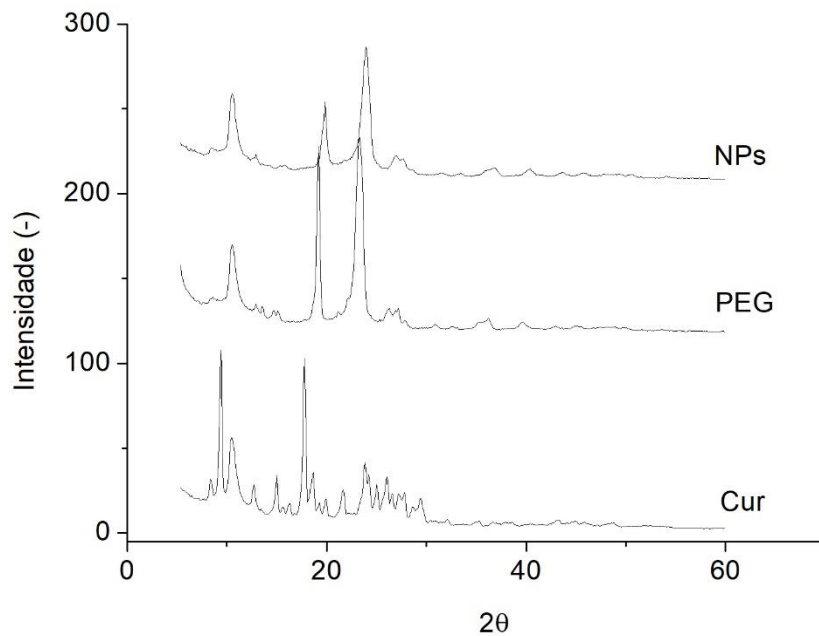
(a) PEG-curcumina.



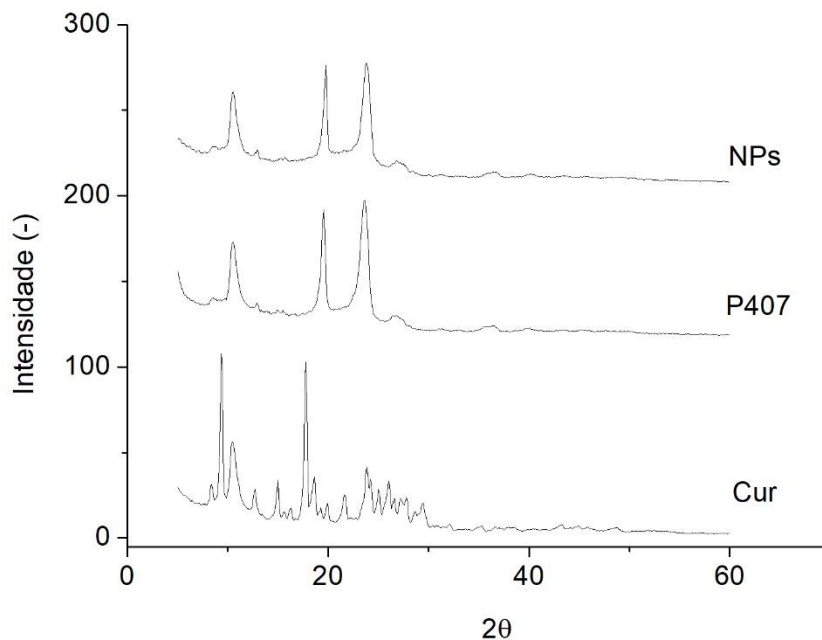
(b) P407-curcumina.

Fonte: Autoria Própria.

Figura 14. Padrões de Difração de Raios-X para (a) PEG-curcumina e (b) P407-curcumina.



(a) PEG-curcumina.



(b) P407-curcumina.

Fonte: Autoria Própria.

No espectro de FTIR é possível identificar as bandas características da curcumina em  $3510\text{ cm}^{-1}$  atribuídas ao grupo hidroxila (O-H),  $1630\text{ cm}^{-1}$  (grupos

carbonila, C = O) e  $1500\text{ cm}^{-1}$  (ligações C = C). Os dois polímeros, exibiram bandas de absorção em aproximadamente  $2900\text{ cm}^{-1}$  (C-H) e  $1110\text{ cm}^{-1}$  (C-O). A presença da vibração de alongamento da carbonila da curcumina nas MFs (Figura 13) indicou que a estrutura do composto foi mantida, enquanto a ausência da banda do grupo hidroxila nas nanopartículas sugere a sua encapsulação na matriz polimérica (Eloy e Marchetti, 2014; Rocha *et al.*, 2014; Silva-Buzanello *et al.*, 2016).

A natureza cristalina do Poloxamer 407, do PEG e da curcumina pode ser observada pelos padrões de difração de raios-X. Novamente, para ambos os casos os picos de difração de curcumina não foram detectados nas nanopartículas, corroborando os resultados obtidos por DSC e por FTIR.

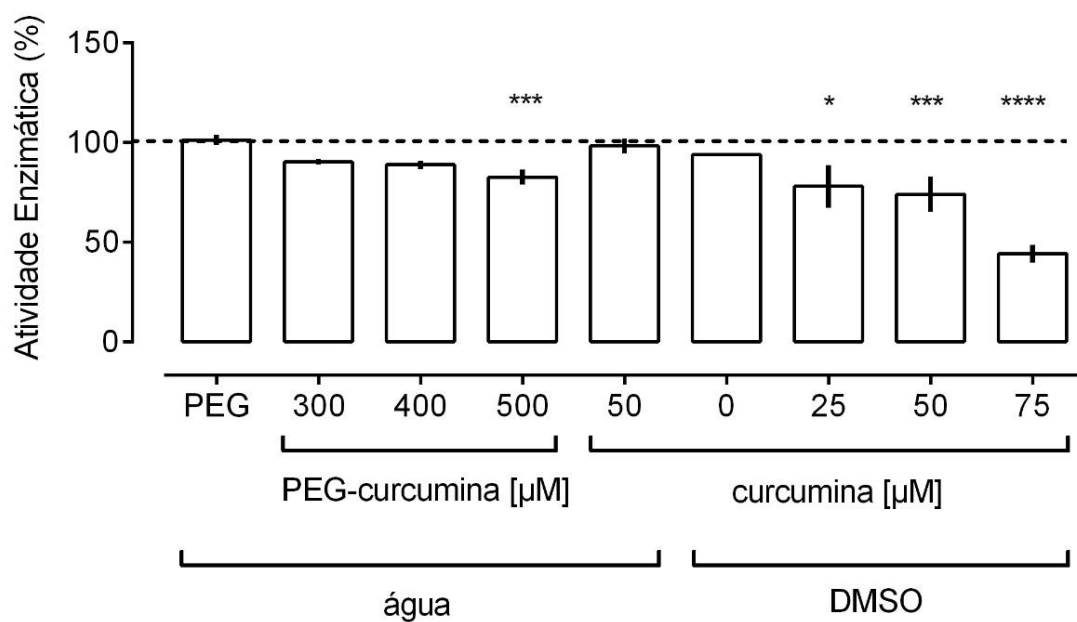
O aumento da estabilidade coloidal da curcumina após a sua encapsulação pode ser atribuído ao tamanho reduzido das nanopartículas. As análises de caracterização físico-químicas demonstraram que a curcumina foi eficientemente encapsulada, formando uma solução sólida com os encapsulantes. Esses fatos também estão de acordo com o estudo de Eloy e Marchetti (2014), que demonstraram que o P407 foi mais eficiente na formação de dispersões sólidas do que outros materiais. Esses resultados encorajam o uso de ambas as dispersões nos ensaios biológicos, já que estas devem apresentar maior atividade em água do que a curcumina no seu estado original.

## 5.2. ANÁLISES ENZIMÁTICAS

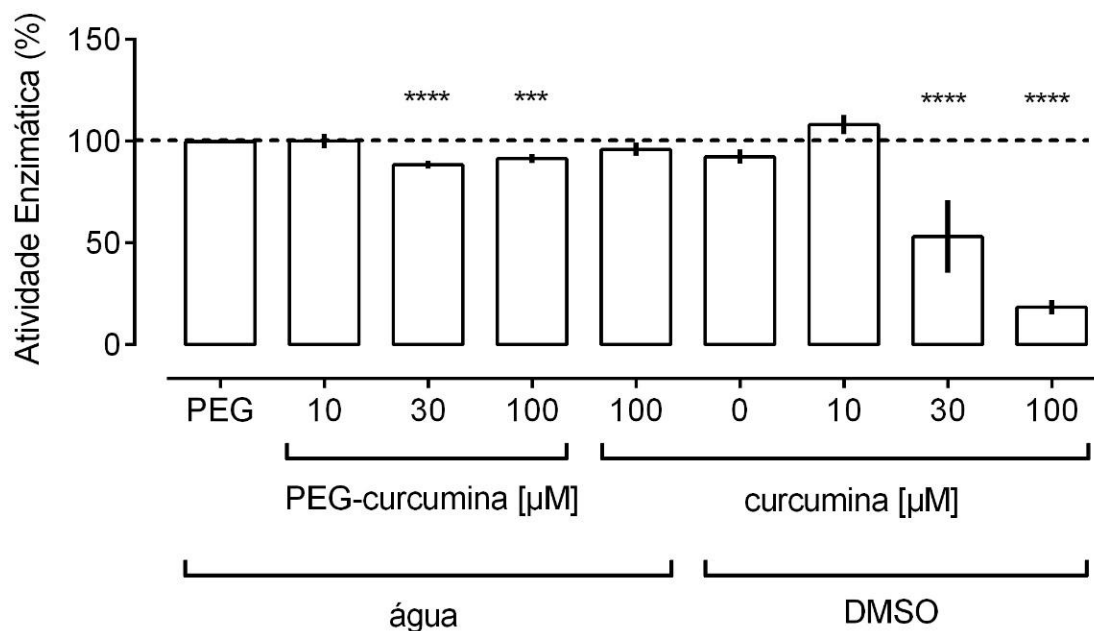
### 5.2.1. Colinesterases

As Figuras 15 e 16 mostram os resultados da atividade da (a) AChE e (b) BChE no tecido de *Drosophila melanogaster* (DM) para as nanopartículas de PEG-curcumina e P407-curcumina, respectivamente. As nanopartículas, curcumina e os encapsulantes foram dispersos em água, enquanto a curcumina também foi dispersa em DMSO.

Figura 15. Efeitos das nanopartículas de PEG-curcumina e da curcumina sobre a atividade das enzimas (a) AChE e (b) BChE no tecido de *Drosophila melanogaster*. Valores expressos em média  $\pm$  SEM (n = 4 por grupo). Significância determinada pela análise de variância unidirecional (ANOVA) seguida do teste de Tukey. \* p < 0,05; \*\*\* p < 0,001; \*\*\*\* p < 0,0001 em comparação ao controle.



(a) AChE.

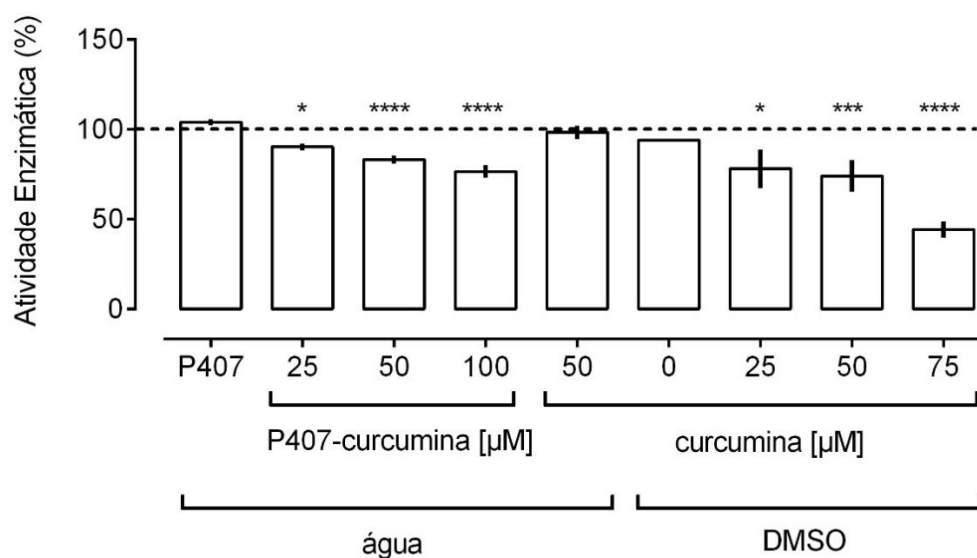


(b) BChE.

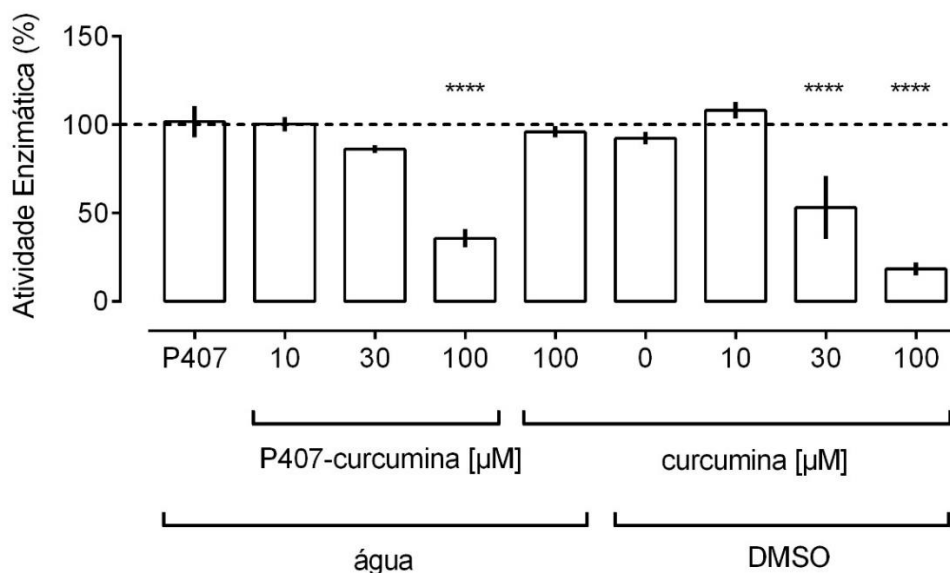
Fonte: Autoria Própria.



Figura 16. Efeitos de nanopartículas de P407-curcumina e curcumina na atividade das enzimas (a) AChE e (b) BChE em tecido de *Drosophila melanogaster*. Valores expressos em média  $\pm$  SEM (n = 4 por grupo). Significância determinada pela análise de variância unidirecional (ANOVA) seguida do teste de Tukey. \* p <0,05; \*\*\* p <0,001; \*\*\*\* p <0,0001 em comparação ao controle.



(a) (AChE)



(b) (BChE)

Fonte: Autoria Própria.

Nanopartículas de curcumina (500  $\mu$ M) inibiram a atividade da enzima AChE (p <0,001). Além disso, a curcumina solubilizada em DMSO 4% iniciou a inibição em 25  $\mu$ M. Enquanto que a uma concentração de 30  $\mu$ M houve uma inibição significativa (p < 0,0001) na atividade da BChE tanto para a curcumina livre quanto para a

encapsulada (IC50 ~ 132,6  $\mu$ M). E por fim, a curcumina livre e o PEG solubilizados em água, não tiveram efeito *per se*.

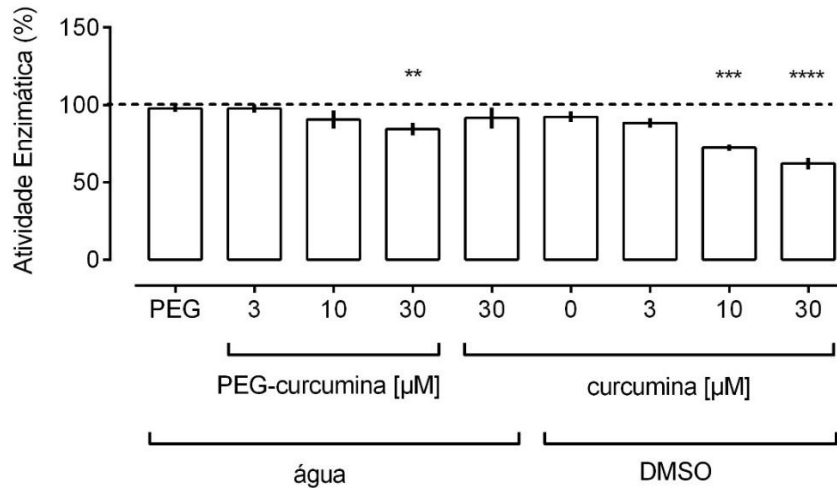
Quando dispersada apenas em água, a curcumina não influenciou a atividade da AChE a 50  $\mu$ M quando comparada ao grupo controle, bem como o P407 não apresentou influência *per se* sobre a atividade da enzima. A dispersão sólida de curcumina (25 e 50  $\mu$ M) diminuiu significativamente a atividade da AChE com IC50 ~ 27,99  $\mu$ M ( $p < 0,05$  e  $p < 0,0001$ , respectivamente) e a curcumina solubilizada em DMSO 4% também inibiu a atividade da enzima na mesma concentração que as nanopartículas. No caso da BChE, a atividade foi modulada pela curcumina em DMSO 4% a 30  $\mu$ M, mas nenhuma inibição foi detectada quando a curcumina foi dispersada em água a 100  $\mu$ M. A dispersão sólida da curcumina foi capaz de inibir a atividade da BChE a 100  $\mu$ M (IC50 ~ 24,89  $\mu$ M), concentração semelhante a da curcumina livre em DMSO 4%.

Os dados obtidos estão de acordo com a literatura, onde a curcumina melhorou o *status* antioxidante com a diminuição na atividade da AChE, exercendo potencial antienvhecimento e aumentando a longevidade (Akinyemi *et al.*, 2018). Abbasi *et al.* (2012) encontraram inibição de 96,5% da atividade da AChE em 500  $\mu$ M e na mesma concentração foi observada a inibição de 97,8% da enzima BChE quando utilizaram curcumina na forma livre em tampão fosfato. A diminuição nas atividades da AChE e BChE poderia levar a um aumento nos níveis de ACh na fenda sináptica, este acúmulo de ACh poderia implicar em estimulação de seus receptores (Charpentier e Fournier, 2001). O fato de inibir as enzimas quando dissolvidas em água é importante, pois demonstra que o comportamento hidrofóbico da curcumina foi superado devido a sua transformação em uma dispersão sólida amorfa, mantendo a mesma ação natural.

#### 5.2.2. Glutathione S-transferase (GST)

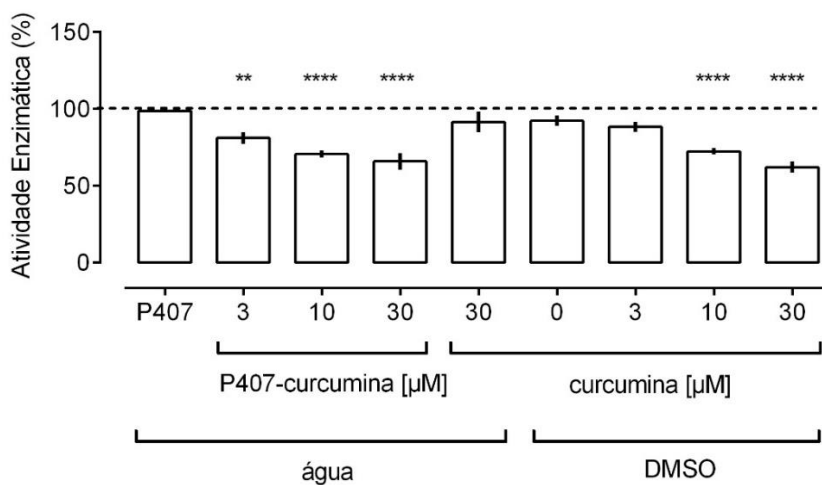
As Figuras 17 e 18 apresentam os resultados da atividade da GST com curcumina solubilizada em DMSO 4% e nanopartículas de PEG-curcumina e P407-curcumina dispersas em água, respectivamente.

Figura 17. Efeitos das nanopartículas de PEG-curcumina e da curcumina na atividade da enzima GST no tecido de *Drosophila melanogaster*. Valores expressos em média  $\pm$  SEM (n = 4 por grupo). Significância determinada pela análise de variância unidirecional (ANOVA) seguida do teste de Tukey. \*\* p <0,01; \*\*\* p <0,001; \*\*\*\* p <0,0001 em comparação ao controle.



Fonte: Autoria Própria.

Figura 18. Efeitos das nanopartículas de P407-curcumina e da curcumina na atividade da enzima GST no tecido de *Drosophila melanogaster*. Valores expressos em média  $\pm$  SEM (n = 4 por grupo). Significância determinada pela análise de variância unidirecional (ANOVA) seguida do teste de Tukey. \*\* p <0,01; \*\*\*\* p <0,0001 em comparação ao controle.



Fonte: Autoria Própria.

As nanopartículas de curcumina (PEG-curcumina) causaram uma diminuição significativa da atividade da GST ( $p < 0,01$ ) na concentração de 30 Mm ( $IC_{50} = 85,53 \mu M$ ). A curcumina modulou a atividade ( $p < 0,0001$ ) nas concentrações de 10 e 30  $\mu M$ . Não foi detectada influência na GST para o PEG *per se* e curcumina em água, demonstrando a hidrofiliçidade melhorada da dispersão sólida. A curcumina mostrou influenciar a capacidade antioxidante de algumas enzimas no organismo como a superóxido dismutase, glutathione peroxidase e catalase (Agarwal, Goel e Behari, 2010). Além disso, compostos fenólicos interagem com a GST modulando sua ação (Hayeshi *et al.*, 2007).

As nanopartículas de P407-curcumina em água causaram a diminuição significativa na atividade da glutathione S-transferase ( $p < 0,01$  e  $p < 0,0001$ ) em 3  $\mu M$  e 10  $\mu M$  ( $IC_{50} = 8,86 \mu M$ ), respectivamente. A curcumina modulou ( $p < 0,0001$ ) a atividade em concentrações de 10 e 30  $\mu M$  quando dissolvida previamente em DMSO. Não foi detectada influência na GST para o P407 *per se* e também para a curcumina em água, demonstrando a melhoria da hidrofiliçidade da dispersão sólida.

Sabendo que a GST é uma enzima detoxificante, a sua inibição pode ter influência toxicológica, tal como uma desintoxicação celular reduzida, no entanto, autores já demonstraram a ação antioxidante da curcumina no organismo (Agarwal, Goel e Behari, 2010), tornando-a capaz de modificar a capacidade antioxidante de algumas enzimas no combate a essas toxinas. Além disso, a atividade excessiva da enzima está associada à resistência a medicamentos, que é observada durante o tratamento de doenças como o câncer. Tal resistência impede que essas doenças sejam tratadas eficientemente, assim, a redução na atividade enzimática da GST através da curcumina pode ser explicada e torna-se interessante (Appiah-Opong *et al.*, 2009; Burg e Mulder, 2002; Hayeshi *et al.*, 2007)

## 6. CONCLUSÕES E TRABALHOS FUTUROS

O poli(etileno glicol) e Poloxamer 407 foram utilizados na encapsulação de curcumina pela técnica de dispersão sólida. As análises de caracterização físico-químicas demonstraram que a curcumina foi encapsulada na matriz polimérica de forma eficiente, passando de um estado cristalino para uma solução amorfa sólida. Foram formadas nanopartículas que puderam ser prontamente dispersas em água.

As nanopartículas dispersas em água foram capazes de modular a atividade das enzimas acetilcolinesterase, butirilcolinesterase e glutatona S-transferase. O maior efeito em sistemas aquosos pode ser justificado pelo encapsulamento eficiente da curcumina em P407, que apresenta conhecida capacidade surfactante.

Portanto, estes resultados demonstram que a dispersão sólida preparada com o auxílio do ultrassom é uma forma adequada e rápida para superar a baixa solubilidade da curcumina em água e/ou permitir a sua dispersão completa em água. Adicionado a isso, a curcumina manteve suas propriedades biológicas em enzimas dos sistemas colinérgico e antioxidante do organismo.

Para trabalhos futuros, sugere-se a realização de estudos *in vivo*, para analisar os efeitos endógenos do aumento de afinidade pela água e aplicabilidade do composto, em sistemas completos alternativos. Testes de avaliação de nanotoxicidade também podem ser realizados a fim de complementar os estudos.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBASI, M. A.; ILYAS, M.; AZIZ-UR-REHMAN; SONIA, A.; SHAHWAR, D.; RAZA, M. A.; KHAN, K. M.; ASHRAF, M.; AFZAL, I.; AMBREEN, N. Curcumin and its derivatives: Moderate inhibitors of acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase and trypsin. **Scientia Iranica**, v. 19, n. 6, p. 1580–1583, dez. 2012.
- AGARWAL, R.; GOEL, S. K.; BEHARI, J. R. Detoxification and antioxidant effects of curcumin in rats experimentally exposed to mercury. **Journal of Applied Toxicology**, v. 30, n. 5, p. n/a–n/a, 2010.
- AKHAVAN, S.; JAFARI, S. M. Nanoencapsulation of Natural Food Colorants. *In: Nanoencapsulation of Food Bioactive Ingredients*. [s.l.] Elsevier, 2017. p. 223–260.
- AKINYEMI, A. J.; OBOH, G.; OGUNSUYI, O.; ABOLAJI, A. O.; UDOFIA, A. Curcumin-supplemented diets improve antioxidant enzymes and alter acetylcholinesterase genes expression level in *Drosophila melanogaster* model. **Metabolic Brain Disease**, v. 33, n. 2, p. 369–375, 28 abr. 2018.
- ALI, W.; WILLIAMS, A. C.; RAWLINSON, C. F. Stoichiometrically governed molecular interactions in drug: Poloxamer solid dispersions. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 391, n. 1-2, p. 162–168, maio 2010.
- ALMEIDA, M. DE; ROCHA, B. A. DA; FRANCISCO, C. R. L.; MIRANDA, C. G.; SANTOS, P. D. DE F.; ARAÚJO, P. H. H. DE; SAYER, C.; LEIMANN, F. V.; GONÇALVES, O. H.; BERSANI-AMADO, C. A. Evaluation of the in vivo acute antiinflammatory response of curcumin-loaded nanoparticles. **Food & Function**, v. 9, n. 1, p. 440–449, 2018.
- ALTINKAYNAK, C.; TAVLASOGLU, S.; YZDEMIR, N.; OCSOY, I. A new generation approach in enzyme immobilization: Organic-inorganic hybrid nanoflowers with enhanced catalytic activity and stability. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 93-94, p. 105–112, nov. 2016.
- AMALRAJ, A.; PIUS, A.; GOPI, S.; GOPI, S. Biological activities of curcuminoids, other biomolecules from turmeric and their derivatives – A review. **Journal of Traditional and Complementary Medicine**, v. 7, n. 2, p. 205–233, abr. 2017.
- APIDIANAKIS, Y.; RAHME, L. G. *Drosophila melanogaster* as a model for human intestinal infection and pathology. **Disease Models & Mechanisms**, v. 4, n. 1, p. 21–30, 1 jan. 2011.

APPIAH-OPONG, R.; COMMANDEUR, J. N. M.; ISTYASTONO, E.; BOGAARDS, J. J.; VERMEULEN, N. P. E. Inhibition of human glutathione S -transferases by curcumin and analogues. **Xenobiotica**, v. 39, n. 4, p. 302–311, abr. 2009.

ATKINSON, H. J.; BABBITT, P. C. Glutathione Transferases Are Structural and Functional Outliers in the Thioredoxin Fold. **Biochemistry**, v. 48, n. 46, p. 11108–11116, 24 nov. 2009.

BAGHEL, S.; CATHCART, H.; O'REILLY, N. J. Polymeric Amorphous Solid Dispersions: A Review of Amorphization, Crystallization, Stabilization, Solid-State Characterization, and Aqueous Solubilization of Biopharmaceutical Classification System Class II Drugs. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 105, n. 9, p. 2527–2544, set. 2016.

BARBOSA, G. V.; SÁ, I. S. DE; FISCHER, E. K.; MEDEIROS, T. A. DE; SOARES, M.; CAVALHEIRO, A. A. Morphological Characterization of Nickel-Silica Nanocomposite in Residual Carbon Obtained by Direct Polymeric Route. v. 881, p. 441–446, nov. 2017.

BELLEN, H. J.; TONG, C.; TSUDA, H. 100 years of Drosophila research and its impact on vertebrate neuroscience: a history lesson for the future. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 11, n. 7, p. 514–522, 9 jul. 2010.

BERG, J. M.; TYMOCZKO, J. L.; STRYER, L. **Bioquímica**. [s.l.: s.n.].

BOARD, P. G.; MENON, D. Glutathione transferases, regulators of cellular metabolism and physiology. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, v. 1830, n. 5, p. 3267–3288, maio 2013.

BONO, G. F.; SIMÃO-SILVA, D. P.; BATISTELA, M. S.; JOSVIK, N. D.; DIAS, P. F. R.; NASCIMENTO, G. A.; SOUZA, R. L. R.; PIOVEZAN, M. R.; SOUZA, R. K. M.; FURTADO-ALLE, L. Butyrylcholinesterase: K variant, plasma activity, molecular forms and rivastigmine treatment in Alzheimer's disease in a Southern Brazilian population. **Neurochemistry International**, v. 81, p. 57–62, fev. 2015.

BOONLAI, W.; TANTISHAIYAKUL, V.; HIRUN, N.; PHAISAN, S.; UMA, T. The effect of the preservative methylparaben on the thermoresponsive gelation behavior of aqueous solutions of poloxamer 407. **Journal of Molecular Liquids**, v. 240, p. 622–629, ago. 2017.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical**

**Biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248–254, maio 1976.

BRASIL. LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008. 8 out. 2008.

BURG, D.; MULDER, G. J. Glutathione Conjugates and Their Synthetic Derivatives as Inhibitors of Glutathione-Dependent Enzymes Involved in Cancer and Drug Resistance. **Drug Metabolism Reviews**, v. 34, n. 4, p. 821–863, 27 jan. 2002.

BURGOS-MORÓN, E.; CALDERÓN-MONTAÑO, J. M.; SALVADOR, J.; ROBLES, A.; LÓPEZ-LÁZARO, M. The dark side of curcumin. **International Journal of Cancer**, v. 126, n. 7, p. NA–NA, 2010.

CHANDRAN, B.; GOEL, A. A Randomized, Pilot Study to Assess the Efficacy and Safety of Curcumin in Patients with Active Rheumatoid Arthritis. **Phytotherapy Research**, v. 26, n. 11, p. 1719–1725, nov. 2012.

CHARPENTIER, A.; FOURNIER, D. Levels of Total Acetylcholinesterase in *Drosophila melanogaster* in Relation to Insecticide Resistance. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 70, n. 2, p. 100–107, jun. 2001.

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

DAS, R. K.; KASOJU, N.; BORA, U. Encapsulation of curcumin in alginate-chitosan-pluronic composite nanoparticles for delivery to cancer cells. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 6, n. 1, p. 153–160, fev. 2010.

DONNELLY, C.; TIAN, Y.; POTTER, C.; JONES, D. S.; ANDREWS, G. P. Probing the Effects of Experimental Conditions on the Character of Drug-Polymer Phase Diagrams Constructed Using Flory-Huggins Theory. **Pharmaceutical Research**, v. 32, n. 1, p. 167–179, 30 jan. 2015.

ELLMAN, G. L. Tissue sulfhydryl groups. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 82, n. 1, p. 70–77, maio 1959.

ELOY, J. O.; MARCHETTI, J. M. Solid dispersions containing ursolic acid in Poloxamer 407 and PEG 6000: A comparative study of fusion and solvent methods. **Powder Technology**, v. 253, p. 98–106, fev. 2014.

EZHILARASI, P. N.; KARTHIK, P.; CHHANWAL, N.; ANANDHARAMAKRISHNAN, C. Nanoencapsulation Techniques for Food Bioactive Components: A Review. **Food and Bioprocess Technology**, v. 6, n. 3, p. 628–647, 12 mar. 2013.

FAO. Compendium Of Food Additive Specifications. *In*: FAO (Ed.). . **FAO JECFA**



**Monographs**. 67th. ed. Rome: JECFA, 2006. v. 3.

GALINDO-PÉREZ, M. J.; QUINTANAR-GUERRERO, D.; CORNEJO-VILLEGAS, M. DE LOS Á.; ZAMBRANO-ZARAGOZA, M. DE LA L. Optimization of the emulsification-diffusion method using ultrasound to prepare nanocapsules of different food-core oils. **LWT**, v. 87, p. 333–341, jan. 2018.

GIULIANI, A.; CERRETANI, L.; CICHELLI, A. Colors: Properties and Determination of Natural Pigments. *In: Encyclopedia of Food and Health*. 1. ed. [s.l.] Elsevier, 2016. p. 273–283.

GOU, M.; MEN, K.; SHI, H.; XIANG, M.; ZHANG, J.; SONG, J.; LONG, J.; WAN, Y.; LUO, F.; ZHAO, X.; QIAN, Z. Curcumin-loaded biodegradable polymeric micelles for colon cancer therapy in vitro and in vivo. **Nanoscale**, v. 3, n. 4, p. 1558, 2011.

GULLAPALLI, R. P. Soft Gelatin Capsules (Softgels). **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 99, n. 10, p. 4107–4148, out. 2010.

GULLAPALLI, R. P.; MAZZITELLI, C. L. Polyethylene glycols in oral and parenteral formulations—A critical review. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 496, n. 2, p. 219–239, dez. 2015.

HABIG, W. H.; PABST, M. J.; JAKOBY, W. B. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. **The Journal of biological chemistry**, v. 249, n. 22, p. 7130–9, nov. 1974.

HAMAGUCHI, T.; ONO, K.; YAMADA, M. Review: Curcumin and Alzheimer's Disease. **CNS Neuroscience & Therapeutics**, v. 16, n. 5, p. 285–297, out. 2010.

HARISH, G.; VENKATESHAPPA, C.; MYTHRI, R. B.; DUBEY, S. K.; MISHRA, K.; SINGH, N.; VALI, S.; BHARATH, M. M. S. Bioconjugates of curcumin display improved protection against glutathione depletion mediated oxidative stress in a dopaminergic neuronal cell line: Implications for Parkinson's disease. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 18, n. 7, p. 2631–2638, abr. 2010.

HAYESHI, R.; MUTINGWENDE, I.; MAVENGERE, W.; MASIYANISE, V.; MUKANGANYAMA, S. The inhibition of human glutathione S-transferases activity by plant polyphenolic compounds ellagic acid and curcumin. **Food and Chemical Toxicology**, v. 45, n. 2, p. 286–295, fev. 2007.

HIRTH, F. *Drosophila melanogaster* in the Study of Human Neurodegeneration. **CNS & Neurological Disorders - Drug Targets**, v. 9, n. 4, p. 504–523, 1 ago. 2010.

HUGHES, G. A. Nanostructure-mediated drug delivery. **Nanomedicine:**

**Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 1, n. 1, p. 22–30, mar. 2005.

HURD, T. R.; LEBLANC, M. G.; JONES, L. N.; DEGENNARO, M.; LEHMANN, R. Genetic Modifier Screens to Identify Components of a Redox-Regulated Cell Adhesion and Migration Pathway. *In: **Methods in Enzymology***. [s.l.: s.n.]. v. 528p. 197–215.

IQBAL, M.; VALOUR, J.-P.; FESSI, H.; ELAISSARI, A. Preparation of biodegradable PCL particles via double emulsion evaporation method using ultrasound technique. **Colloid and Polymer Science**, v. 293, n. 3, p. 861–873, 7 mar. 2015.

JAFARI, S. M. An overview of nanoencapsulation techniques and their classification. *In: **Nanoencapsulation Technologies for the Food and Nutraceutical Industries***. [s.l.] Elsevier, 2017. p. 1–34.

JENNINGS, B. H. Drosophila – a versatile model in biology & medicine. **Materials Today**, v. 14, n. 5, p. 190–195, maio 2011.

JIA, F.; NARASIMHAN, B.; MALLAPRAGADA, S. Materials-based strategies for multi-enzyme immobilization and co-localization: A review. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 111, n. 2, p. 209–222, fev. 2014.

KABANOV, A. V.; BATRAKOVA, E. V.; ALAKHOV, V. Y. Pluronic® block copolymers as novel polymer therapeutics for drug and gene delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 82, n. 2-3, p. 189–212, ago. 2002.

KADAJJI, V. G.; BETAGERI, G. V. Water Soluble Polymers for Pharmaceutical Applications. **Polymers**, v. 3, n. 4, p. 1972–2009, 11 nov. 2011.

KAMINAGA, Y.; NAGATSU, A.; AKIYAMA, T.; SUGIMOTO, N.; YAMAZAKI, T.; MAITANI, T.; MIZUKAMI, H. Production of unnatural glucosides of curcumin with drastically enhanced water solubility by cell suspension cultures of *Catharanthus roseus*. **FEBS Letters**, v. 555, n. 2, p. 311–316, 4 dez. 2003.

KAWAKAMI, K. Theory and practice of supersaturatable formulations for poorly soluble drugs. **Therapeutic Delivery**, v. 6, n. 3, p. 339–352, abr. 2015.

KAWANISHI, N.; KATO, K.; TAKAHASHI, M.; MIZOKAMI, T.; OTSUKA, Y.; IMAIZUMI, A.; SHIVA, D.; YANO, H.; SUZUKI, K. Curcumin attenuates oxidative stress following downhill running-induced muscle damage. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 441, n. 3, p. 573–578, nov. 2013.

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

KUROIWA, Y.; HIGASHI, K.; UEDA, K.; YAMAMOTO, K.; MORIBE, K. Nano-scale and molecular-level understanding of wet-milled indomethacin/poloxamer 407 nanosuspension with TEM, suspended-state NMR, and Raman measurements. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 537, n. 1-2, p. 30–39, fev. 2018.

LI, Q.; YANG, H.; CHEN, Y.; SUN, H. Recent progress in the identification of selective butyrylcholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 132, p. 294–309, maio 2017.

LOCKRIDGE, O. Review of human butyrylcholinesterase structure, function, genetic variants, history of use in the clinic, and potential therapeutic uses. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 148, p. 34–46, abr. 2015.

M. ARAÚJO, C. R.; L. A. SANTOS, V.; A. GONSALVES, A. Acetylcholinesterase - AChE: A Pharmacological Interesting Enzyme. **Revista Virtual de Química**, v. 8, n. 6, p. 1818–1834, 2016.

MAGHSOUDI, A.; YAZDIAN, F.; SHAHMORADI, S.; GHADERI, L.; HEMATI, M.; AMOABEDINY, G. Curcumin-loaded polysaccharide nanoparticles: Optimization and anticariogenic activity against *Streptococcus mutans*. **Materials Science and Engineering: C**, v. 75, p. 1259–1267, jun. 2017.

MAHMOOD, K.; ZIA, K. M.; ZUBER, M.; SALMAN, M.; ANJUM, M. N. Recent developments in curcumin and curcumin based polymeric materials for biomedical applications: A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 81, p. 877–890, nov. 2015.

MOZAFARI, M. R.; FLANAGAN, J.; MATIA-MERINO, L.; AWATI, A.; OMRI, A.; SUNTRES, Z. E.; SINGH, H. Recent trends in the lipid-based nanoencapsulation of antioxidants and their role in foods. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 86, n. 13, p. 2038–2045, out. 2006.

NELSON, K. M.; DAHLIN, J. L.; BISSON, J.; GRAHAM, J.; PAULI, G. F.; WALTERS, M. A. The Essential Medicinal Chemistry of Curcumin. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 60, n. 5, p. 1620–1637, 9 mar. 2017.

O'KANE, C. J. *Drosophila* as a Model Organism for the Study of Neuropsychiatric Disorders. *In: Brain Imaging in Behavioral Neuroscience*. [s.l: s.n.]. p. 37–60.

ONG, C.; YUNG, L.-Y. L.; CAI, Y.; BAY, B.-H.; BAEG, G.-H. *Drosophila melanogaster* as a model organism to study nanotoxicity. **Nanotoxicology**, v. 9, n. 3, p. 396–403, 3 abr. 2015.

PANDEY, U. B.; NICHOLS, C. D. Human Disease Models in *Drosophila melanogaster* and the Role of the Fly in Therapeutic Drug Discovery. **Pharmacological Reviews**, v. 63, n. 2, p. 411–436, 1 jun. 2011.

PANDIT, S.; KIM, H.-J.; KIM, J.-E.; JEON, J.-G. Separation of an effective fraction from turmeric against *Streptococcus mutans* biofilms by the comparison of curcuminoid content and anti-acidogenic activity. **Food Chemistry**, v. 126, n. 4, p. 1565–1570, jun. 2011.

PISOSCHI, A. M.; POP, A.; CIMPEANU, C.; TURCUȘ, V.; PREDOI, G.; IORDACHE, F. Nanoencapsulation techniques for compounds and products with antioxidant and antimicrobial activity - A critical view. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 157, p. 1326–1345, set. 2018.

POHANKA, M. Cholinesterases, a Target Of Pharmacology and Toxicology. **Biomedical Papers**, v. 155, n. 3, p. 219–223, 1 set. 2011.

POPE, C. N.; BRIMIJOIN, S. Cholinesterases and the fine line between poison and remedy. **Biochemical Pharmacology**, v. 153, n. January, p. 205–216, jul. 2018.

PRASAD, S. N.; MURALIDHARA. Neuroprotective effect of geraniol and curcumin in an acrylamide model of neurotoxicity in *Drosophila melanogaster*: Relevance to neuropathy. **Journal of Insect Physiology**, v. 60, n. 1, p. 7–16, jan. 2014.

PRASAD, S.; TYAGI, A. K.; AGGARWAL, B. B. Recent Developments in Delivery, Bioavailability, Absorption and Metabolism of Curcumin: the Golden Pigment from Golden Spice. **Cancer Research and Treatment**, v. 46, n. 1, p. 2–18, 15 jan. 2014.

PROTEIN DATA BANK. **Crystal structure of human glutathione transferase (GST) - 1PKZ.**

\_\_\_\_\_. **Crystal Structure of Human Acetylcholinesterase - 4PQE.**

PRÜSSIN, K.; VOIGT, A.; SCHULZ, J. B. *Drosophila melanogaster* as a model organism for Alzheimer's disease. **Molecular Neurodegeneration**, v. 8, n. 1, p. 35, 2013.

RHEIN, C. VON; WEIDNER, T.; HENS, L.; MARTIN, J.; WEBER, C.; SLIVA, K.; SCHNIERLE, B. S. Curcumin and *Boswellia serrata* gum resin extract inhibit chikungunya and vesicular stomatitis virus infections in vitro. **Antiviral Research**, v. 125, p. 51–57, jan. 2016.

ROBINSON, S. W.; HERZYK, P.; DOW, J. A. T.; LEADER, D. P. FlyAtlas: database of gene expression in the tissues of *Drosophila melanogaster*. **Nucleic Acids Research**,

v. 41, n. D1, p. D744–D750, 1 jan. 2013.

ROCHA, B. A.; GONÇALVES, O. H.; LEIMANN, F. V.; REBECCA, E. S. W.; SILVA-BUZANELLO, R. A.; FILHO, L. C.; ARAÚJO, P. H. H.; CUMAN, R. K. N.; BERSANI-AMADO, C. A. Curcumin encapsulated in poly-L-lactic acid improves its anti-inflammatory efficacy in vivo. **Advancement in Medicinal Plant Research**, v. 2, n. 4, p. 62–73, 2014.

SÁ, I. S. DE; FISCHER, E. K.; BARBOSA, G. V.; MEDEIROS, T. A. DE; SILVA, M. S. DA; CAVALHEIRO, A. A. Synthesis of Nickel-Silica Nanocomposite Embedded in Amorphous Carbon through the Polymeric Precursor Method. **Materials Science Forum**, v. 881, p. 453–458, nov. 2016.

SAHU, A.; KASOJU, N.; GOSWAMI, P.; BORA, U. Encapsulation of Curcumin in Pluronic Block Copolymer Micelles for Drug Delivery Applications. **Journal of Biomaterials Applications**, v. 25, n. 6, p. 619–639, 5 fev. 2011.

SARANYA, T. S.; RAJAN, V. K.; BISWAS, R.; JAYAKUMAR, R.; SATHIANARAYANAN, S. Synthesis, characterisation and biomedical applications of curcumin conjugated chitosan microspheres. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 110, p. 227–233, abr. 2018.

SEKIGUCHI, K.; OBI, N. Studies on Absorption of Eutectic Mixture. I. A Comparison of the Behavior of Eutectic Mixture of Sulfathiazole and that of Ordinary Sulfathiazole in Man. **CHEMICAL & PHARMACEUTICAL BULLETIN**, v. 9, n. 11, p. 866–872, 1961.

SEKTON, B. Food nanotechnology &ndash; an overview. **Nanotechnology, Science and Applications**, v. 3, n. 1, p. 1, maio 2010.

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.

SHARMA, M. C.; SHARMA, S.; KOHLI, D. V. Some plant extracts used in pharmacologically activity of anxiolytics, antidepressant, analgesic, and anti-inflammatory activity. **Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures**, v. 5, n. 1, p. 223–227, 2010.

SHEN, L.-R.; XIAO, F.; YUAN, P.; CHEN, Y.; GAO, Q.-K.; PARNELL, L. D.; MEYDANI, M.; ORDOVAS, J. M.; LI, D.; LAI, C.-Q. Curcumin-supplemented diets increase superoxide dismutase activity and mean lifespan in *Drosophila*. **AGE**, v. 35, n. 4, p. 1133–1142, 1 ago. 2013.

SHOBA, G.; JOY, D.; JOSEPH, T.; MAJEED, M.; RAJENDRAN, R.; SRINIVAS, P. Influence of Piperine on the Pharmacokinetics of Curcumin in Animals and Human Volunteers. **Planta Medica**, v. 64, n. 04, p. 353–356, 4 maio 1998.

SIGMA ALDRICH. **Curcumin**.

\_\_\_\_. **Polyethylene glycol 6000**.

\_\_\_\_. **Poloxamer 407**.

SILVA, A. C. DA; SANTOS, P. D. DE F.; SILVA, J. T. DO P.; LEIMANN, F. V.; BRACHT, L.; GONÇALVES, O. H. Impact of curcumin nanoformulation on its antimicrobial activity. **Trends in Food Science & Technology**, v. 72, n. January 2017, p. 74–82, fev. 2018.

SILVA-BUZANELLO, R. A. DA; SOUZA, M. F. DE; OLIVEIRA, D. A. DE; BONA, E.; LEIMANN, F. V.; CARDOZO FILHO, L.; ARAÚJO, P. H. H. DE; FERREIRA, S. R. S.; GONÇALVES, O. H. Preparation of curcumin-loaded nanoparticles and determination of the antioxidant potential of curcumin after encapsulation. **Polímeros**, v. 26, n. 3, p. 207–214, 4 ago. 2016.

STEPHENSON, R.; METCALFE, N. Drosophila melanogaster: a fly through its history and current use. **The Journal of the Royal College of Physicians of Edinburgh**, v. 43, n. 1, p. 70–75, 21 mar. 2013.

TADROS, T. F. **Applied Surfactants: Principles and Applications**. 1. ed. ESTADOS UNIDOS DA AMERICA: Wiley-VCH; 1 edition (March 11, 2005), 2005.

TAKAHASHI, M.; SUZUKI, K.; KIM, H.; OTSUKA, Y.; IMAIZUMI, A.; MIYASHITA, M.; SAKAMOTO, S. Effects of Curcumin Supplementation on Exercise-Induced Oxidative Stress in Humans. **International Journal of Sports Medicine**, v. 35, n. 06, p. 469–475, 28 out. 2013.

VENTURA, A. L. M.; ABREU, P. A.; FREITAS, R. C. C.; SATHLER, P. C.; LOUREIRO, N.; CASTRO, H. C. Sistema colinérgico: revisitando receptores, regulação e a relação com a doença de Alzheimer, esquizofrenia, epilepsia e tabagismo. **Archives of Clinical Psychiatry (São Paulo)**, v. 37, n. 2, p. 66–72, 2010.

XIA, X.; PAN, Y.; ZHANG, W.-Y.; CHENG, G.; KONG, L.-D. Ethanolic Extracts from Curcuma longa Attenuates Behavioral, Immune, and Neuroendocrine Alterations in a Rat Chronic Mild Stress Model. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 29, n. 5, p. 938–944, 2006.

YALLAPU, M. M.; GUPTA, B. K.; JAGGI, M.; CHAUHAN, S. C. Fabrication of curcumin

encapsulated PLGA nanoparticles for improved therapeutic effects in metastatic cancer cells. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 351, n. 1, p. 19–29, nov. 2010.

YALLAPU, M. M.; JAGGI, M.; CHAUHAN, S. C.  $\beta$ -Cyclodextrin-curcumin self-assembly enhances curcumin delivery in prostate cancer cells. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 79, n. 1, p. 113–125, ago. 2010.

YANG, K.-Y.; LIN, L.-C.; TSENG, T.-Y.; WANG, S.-C.; TSAI, T.-H. Oral bioavailability of curcumin in rat and the herbal analysis from *Curcuma longa* by LC–MS/MS. **Journal of Chromatography B**, v. 853, n. 1-2, p. 183–189, 15 jun. 2007.

ZHANG, J.; GREK, C.; YE, Z.-W.; MANEVICH, Y.; TEW, K. D.; TOWNSEND, D. M. Pleiotropic Functions of Glutathione S-Transferase P. *In: Advances in Cancer Research*. 1. ed. [s.l.] Elsevier Inc., 2014. v. 122p. 143–175.