

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

PATRÍCIA APARECIDA MACÁRIO BORSATO

**PRODUÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE CURCUMINA COM
POLICAPROLACTONA (PCL) E AVALIAÇÃO DA NANOTOXICIDADE EM
*Drosophila melanogaster***

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

CAMPO MOURÃO

2020

PATRÍCIA APARECIDA MACÁRIO BORSATO

**PRODUÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE CURCUMINA COM
POLICAPROLACTONA (PCL) E AVALIAÇÃO DA NANOTOXICIDADE EM
*Drosophila melanogaster***

**PRODUCTION OF CURCUMIN NANOPARTICLES IN POLYCAPROLACTONE (PCL)
AND NANOTOXICITY AVALUATION IN *Drosophila melanogaster***

Dissertação de Mestrado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, como requisito 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

2020



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

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



Ministério da Educação
Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Câmpus Medianeira



PATRICIA APARECIDA MACARIO BORSATO

PRODUÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE CURCUMINA COM POLICAPROLACTONA (PCL) E AVALIAÇÃO DA NANOTOXICIDADE EM DROSOPHILA MELANOGASTER

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

Data de aprovação: 23 de Outubro de 2020

Prof Rafael Porto Ineu, - Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Prof.a Claudia Sayer, Doutorado - Universidade Federal de Santa Catarina (Ufsc)

Prof.a Patricia Appelt, - Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Documento gerado pelo Sistema Acadêmico da UTFPR a partir dos dados da Ata de Defesa em 02/03/2021.

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

RESUMO

A curcumina, um pigmento amarelo-alaranjado isolado do rizoma da *Curcuma longa*, apresenta propriedades biológicas e farmacológicas com potencial terapêutico no tratamento de diversas doenças crônicas, bem como atividade antioxidante e anti-inflamatória. No entanto, a curcumina possui barreiras tecnológicas que limitam sua aplicação, como a baixa solubilidade em água e baixa biodisponibilidade. Nesse contexto, abordagens com base em nanotecnologia vem ganhando atenção devido ao seu potencial em alterar/melhorar os efeitos da curcumina, tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Entretanto, até o momento pouco é conhecido em relação a toxicidade das nanopartículas contendo curcumina em modelos animais. Para isso, a *Drosophila melanogaster*, reconhecida como um organismo teste alternativo, vem sendo utilizada para a avaliação da toxicidade ou benefício de compostos bioativos. Assim, o objetivo deste trabalho foi produzir e caracterizar nanopartículas de curcumina encapsuladas em policaprolactona (PCL) e avaliar a sua toxicidade utilizando a mosca da fruta (*Drosophila melanogaster*) como modelo biológico alternativo. As nanopartículas foram caracterizadas por análises de Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC), Espectrofotometria de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR), Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM), Difração de Raios-X (DRX) e Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS). Foram obtidas nanopartículas esféricas com diâmetro médio igual a 215 ± 2 nm, de acordo com as análises de DLS e corroboradas pelas imagens de microscopia. No espectro de FTIR da curcumina foi possível identificar as bandas de absorção que são geralmente utilizados para identificar esse composto, o qual não foi identificado na amostra de nanopartículas contendo curcumina. O pico de fusão da curcumina também não foi observada nas nanopartículas, e a temperatura de fusão cristalina do PCL não foi alterada quando comparadas às nanopartículas sem adição de curcumina. Resultados *in vivo* utilizando *Drosophila melanogaster* demonstraram que as nanopartículas contendo curcumina apresentaram taxa de mortalidade significativa somente na maior dose (100 μ M) avaliada, tratamento utilizando curcumina livre não apresentou efeito na mortalidade. Mudança no desempenho locomotor das moscas foi observado a partir da dose de 30 μ M para ambos tratamentos. Nos testes *ex vivo*, houve inibição significativa na atividade da AChE e da BChE, ambas em 100 μ M. A atividade da Catalase foi influenciada tanto no tratamento com nanopartículas contendo curcumina quanto para curcumina livre a partir de 10 μ M. Tióis totais apresentou diferença significativa em relação ao controle em 30 e 100 μ M para as nanopartículas contendo curcumina, e em 30 μ M para curcumina livre, para grupos tióis não proteico nenhuma diferença significativa foi observada para todos os tratamentos. Os resultados indicam que foi possível encapsular a curcumina na matriz polimérica da policaprolactona, bem como sugere uma baixa nanotoxicidade utilizando um modelo biológico alternativo.

Palavras-chave: polifenóis; toxicidade; encapsulação; mosca da fruta, miniemulsificação.

ABSTRACT

Curcumin, an orange-yellow pigment isolated from *Curcuma longa* rhizome, has biological and pharmacological properties with therapeutic potential in the treatment of various chronic diseases, as well as antioxidant and anti-inflammatory activity. However, curcumin has technological barriers that limit its application such as low solubility and low bioavailability. In this context, nanotechnology-based approaches are gaining attention due to their potential to alter / improve the *in vitro* and *in vivo* effects of curcumin. However, so far little is known regarding the toxicity of curcumin-containing nanoparticles in animal models. For this, *Drosophila melanogaster*, recognized as an alternative test organism, has been used to evaluate the toxicity or benefit of bioactive compounds. Thus, the objective of this work was to produce polycaprolactone encapsulated curcumin nanoparticles (PCL) and to evaluate its toxicity using the fruit fly (*Drosophila melanogaster*) as an alternative biological model. The nanoparticles were characterized by Differential Scanning Calorimetry (DSC), Infrared Spectrophotometry (FTIR), Transmission Electron Microscopy (TEM), X-ray Diffraction (XRD) and Dynamic Light Scattering (DLS) analyzes. Spherical nanoparticles with mean diameter equal to 215 ± 2 nm were obtained according to DLS analysis and corroborated by microscopy images. In the curcumin FTIR spectrum it was possible to identify the absorption bands that are generally used to identify this compound, which was not identified in the curcumin-containing nanoparticle sample. The curcumin melting peak was also not observed in the nanoparticles, and the crystalline melting temperature of the PCL was not changed when compared to the curcumin-free nanoparticles. *In vivo* results using *Drosophila melanogaster* demonstrated that nanoparticles containing curcumin showed a significant mortality rate only at the highest dose (100 μ M) evaluated, treatment using free curcumin had no effect on mortality. Change in the locomotor performance of the flies was observed from the dose of 30 μ M for both treatments. In *ex vivo* tests, there was a significant inhibition of AChE and BChE activity, both at 100 μ M. Catalase activity was influenced both in the treatment with nanoparticles containing curcumin and for free curcumin from 10 μ M. Total thiols showed a significant difference in relation to the control at 30 and 100 μ M for nanoparticles containing curcumin, and at 30 μ M for free curcumin. Non-protein thiols, no significant difference was observed for any of the treatments. The results indicate that it was possible to encapsulate curcumin in the polymeric matrix of polycaprolactone, as well as suggest a low nanotoxicity using an alternative biological model.

Keywords: polyphenols; toxicity; encapsulation; fruit fly; miniemulsification.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura química da curcumina.....	18
Figura 2. Estrutura química da Policaprolactona.....	21
Figura 3. Fisiologia da sinapse colinérgica.....	26
Figura 4. Ilustração dos principais produtores de EROS e da defesa antioxidante em neurônios e glia	29
Figura 5. Imagens obtidas por Microscopia Eletrônica de Transmissão das nanopartículas branco.....	38
Figura 6. Imagens obtidas por Microscopia Eletrônica de Transmissão das nanopartículas NP-curcumina.	38
Figura 7. Distribuição dos tamanhos das nanopartículas determinados por difração de laser (DLS).	39
Figura 8. Curvas de DSC da curcumina, mistura física, NP-curcumina, NP-branco. ...	40
Figura 9. Espectro de Infravermelho com Transformada de Fourier das NP-branco, NP-curcumina, Curcumina pura, Mistura-física.	41
Figura 10. Resultados de Difração de Raios-X do PCL (NP-branco), curcumina, mistura física, Nanopartículas de curcumina (NP-curcumina).	42
Figura 11. Efeito da dieta suplementada com nanopartículas de curcumina (A) e curcumina livre (B) na taxa de sobrevivência em <i>D. melanogaster</i> . Os dados são apresentados como a média ± erro padrão. Cada ensaio foi realizado em cinco experiências independentes (*p<0,05 em relação ao controle). O grupo controle recebeu dieta com suplemento padrão e água.	43
Figura 12. Efeito de nanopartículas carregadas com curcumina (NP-curcumina) e curcumina livre na função locomotora em DM. Taxa de escalada (expressa como o tempo gasto em segundos para escalar 8 cm) em moscas suplementadas com (a) Nanopartículas carregadas com curcumina e (b) Curcumina. Número de moscas no topo (expresso como porcentagem de escalada de 6 cm em 5 s) por ensaio de base topo em moscas suplementadas com (c) Nanopartículas carregadas com curcumina e (d) curcumina. A linha tracejada representa os valores do controle. Os dados são apresentados como a média ± erro padrão. Cada ensaio foi realizado em cinco experiências independentes (*p<0,05 em relação ao controle). Os grupos de controle receberam dieta com suplemento padrão e água.	44

Figura 13. Efeito de nanopartículas carregadas com curcumina (NP-curcumina) e curcumina livre na função comportamental em DM. Valores de cruzamento (expressos como número de cruzamentos de uma área de 1 cm ²) em moscas suplementadas com (A) NP-curcumina e (B) Curcumina. A linha tracejada representa os valores do controle. Os dados são apresentados como a média ± erro padrão. Cada ensaio foi realizado em cinco experiências independentes (*p<0,05; **p<0,01 em relação ao controle). Os grupos de controle receberam dieta com suplemento padrão e água.	47
Figura 14. Efeito das nanopartículas contendo curcumina e curcumina livre na atividade da enzima AChE <i>ex vivo</i> no tecido de <i>Drosophila melanogaster</i> . A linha tracejada representa o valor do grupo controle. Valores expressos em média ± erro padrão (n = 5 por grupo). Significância determinada pela análise de variância unidirecional (ANOVA) seguida do teste de Tukey. (*p<0,05; **p<0,01 em relação ao controle).	48
Figura 15. Efeito das nanopartículas contendo curcumina e curcumina livre na atividade da enzima BChE <i>ex vivo</i> no tecido de <i>Drosophila melanogaster</i> . A linha tracejada representa o valor do grupo controle. Valores expressos em média ± erro padrão (n = 5 por grupo). Significância determinada pela análise de variância.....	49
Figura 16. Efeito das nanopartículas contendo curcumina e curcumina livre na atividade da enzima CAT <i>ex vivo</i> no tecido de <i>Drosophila melanogaster</i> . A linha tracejada representa o valor do grupo controle. Valores expressos em média ± erro padrão (n = 5 por grupo). Significância determinada pela análise de variância unidirecional (ANOVA) seguida do teste de Tukey. (*p<0,05; ** p <0,01 em relação ao controle).	51
Figura 17. Efeito das nanopartículas contendo curcumina e curcumina livre nos níveis de Tióis totais (A) e Tióis não proteico (B) <i>ex vivo</i> no tecido de <i>Drosophila melanogaster</i> . A linha tracejada representa o valor do grupo controle. Valores expressos em média ± erro padrão (n = 5 por grupo). Significância determinada pela análise de variância unidirecional (ANOVA) seguida do teste de Tukey. (*p<0,05; ** p <0,01 em relação ao controle).	51

LISTA DE ABREVIATURA DE SIGLAS E SÍMBOLOS

ACh	Acetilcolina
AChE	Acetilcolinesterase
BChE	Butirilcolinesterase
ChE	Colinesterase
DM	<i>Drosophila melanogaster</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DRX	Difração de Raios-X
DSC	Calorímetro Diferencial de Varredura
DTNB	5,5'-Dithiobis (ácido 2-nitrobenzóico)
ECVAM	Centro Europeu de Validação de Métodos Alternativos
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FDA	Food and Drug Administration
FTIR	Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier
GSH	Glutationa reduzida
GST	Glutationa S-transferase
KBr	Brometo de potássio
NPs	Nanopartículas
PCL	Policaprolactona
NP-curcumina	Nanopartículas de curcumina nanoencapsuladas por
S1	Policaprolactona
	Sobrenadante
SNC	Sistema nervoso central
SNP	Sistema nervoso periférico
TCA	Ácido tricloroacético
Tris-HCL	Hidroximetil aminometano
TFK	Tampão fosfato de potássio
UV-Vis	Ultravioleta e visível

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 OBJETIVOS	16
2.1 Objetivo Geral	16
2.2 Objetivos Específicos	16
3 REVISÃO DE LITERATURA	17
3.1 COMPOSTOS BIOATIVOS	17
3.2 CURCUMINA	17
3.3 NANOTECNOLOGIA	19
3.4 TÉCNICAS DE NANOENCAPSULAÇÃO	20
3.5 ENCAPSULANTES POLIMÉRICOS	20
3.5.1 Policaprolactona.....	21
3.6 TOXICIDADE	21
3.6.1 Nanotoxicidade.....	22
3.7 <i>Drosophila melanogaster</i> (DM)	23
3.8 SISTEMAS COLINÉRGICOS	25
3.9 ESTRESSE OXIDATIVO	27
3.10 ENZIMAS ANTIOXIDANTES	29
4 MATERIAIS E MÉTODOS	31
4.1 Materiais	31
4.2 Preparo das nanopartículas de NP-curcumina	31
4.3 Caracterização das nanopartículas	32
4.4 Análises biológicas	33
4.4.1 Estoque de moscas.....	33
4.4.2 Ensaio <i>in vivo</i>	33
4.4.2.1 Taxa de sobrevivência/mortalidade	33
4.4.2.2 Geotaxia negativa.....	33
4.4.2.3 Teste Base-Topo	34
4.4.2.4 Teste de campo aberto.....	34
4.4.3 Ensaio <i>ex vivo</i>	35
4.4.3.1 Preparação do homogeneizado para as análises biológicas.....	35
4.4.3.2 Determinação de atividade da acetilcolinesterase (AChE).....	35
4.4.3.3 Determinação de atividade da Butirilcolinesterase (BChE)	35
4.4.3.4 Determinação de atividade da catalase (CAT)	36
4.4.3.5 Determinação de grupos tióis	36
4.4.3.6 Determinação da concentração de proteína.....	37
4.5 Análise estatística	37
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
5.1 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS	38

5.2 ENSAIOS <i>in vivo</i> EM <i>D. melanogaster</i>	43
5.2.1 Taxa de Sobrevivência	43
5.2.2 Desempenho locomotor	44
5.3 ENSAIOS <i>ex vivo</i> EM <i>D. melanogaster</i>	48
5.3.1 Determinação da atividade das colinesterases AChE e BChE.....	48
5.3.1 Determinação da atividade de enzimas antioxidantes CAT e Grupos Tióis ..	51
6 CONCLUSÃO	54
7 PERSPECTIVAS FUTURAS	55
REFERÊNCIAS	56

1 INTRODUÇÃO

Fitoquímicos são compostos bioativos naturais encontrados a partir de fontes vegetais e que apresentam atividades de manutenção da saúde e prevenção de doenças humanas (CHUAN et al., 2017). Dentre eles, a curcumina, que é um composto polifenólico hidrofóbico de baixa massa molar (CHUAN et al., 2017; HUSSAIN et al., 2017a), pigmento amarelo-alaranjado isolado do rizoma da *Curcuma longa* (família *Zingiberaceae*) e usada comumente na medicina tradicional chinesa (SHI et al., 2018; WIGGERS et al., 2017). A curcumina possui diversas propriedades biológicas e farmacológicas com potencial terapêutico no tratamento de doenças cardiovasculares e neurodegenerativas (HUSSAIN et al., 2017b). Além disso, estudos apontam atividade antioxidante e sequestrante de radicais livres, bem como eficiente ação anti-inflamatória (KANT et al., 2014). No entanto, esta substância possui barreiras que podem dificultar seu uso e disponibilidade, como sua baixa solubilidade em água e suscetibilidade a condições alcalinas, luz, tratamento térmico, íons metálicos, enzimas, dentre outros, que também limitam sua aplicação em formulações de alimentos e medicamentos (CODEVILLA et al., 2015; HUSSAIN et al., 2017b).

Novas estratégias são necessárias para abordar as questões relacionadas à solubilidade em água e a instabilidade química. Nesse contexto, vem sendo aplicada técnicas de nanotecnologia com ênfase na caracterização, fabricação e manipulação de nanoestruturas. Estas aplicações na ciência dos alimentos tendem a impactar os aspectos vitais da indústria alimentícia e afins, desde a segurança alimentar até a síntese molecular de novos produtos e ingredientes (PATHAKOTI; MANUBOLU; HWANG, 2017). Abordagens com base em nanotecnologia ganharam atenção devido ao seu potencial em alterar/melhorar as atividades *in vitro* e *in vivo* da curcumina (HUSSAIN et al., 2017a).

Dentre as técnicas de encapsulação, a produção de nanopartículas poliméricas pode ser realizada pela técnica da miniemulsificação/evaporação do solvente que consiste, de modo geral, em dispersar o material ativo em um polímero seguro (MUSYANOVYCH et al., 2008; PICH et al., 2006). Alguns encapsulantes vem sendo utilizados com muita eficiência e sem toxicidade. A policaprolactona (PCL) apresenta-se como um poliéster alifático e linear, semicristalino e de baixo custo, recomendado para utilização como agente encapsulante em sistemas de liberação prolongada devido a sua

lenta degradação no organismo. Deste modo, a PCL apresenta alta estabilidade e melhoria do valor terapêutico de drogas nanoencapsuladas (FERREIRA, 2013).

De modo geral, atualmente as pesquisas voltadas à toxicidade das nanoestruturas utilizadas na ciência dos alimentos são muito limitadas, e em contraste com os efeitos benéficos já apresentados, pouco se sabe a respeito da toxicidade celular dos antioxidantes na forma nanoencapsulado. As propriedades comuns compartilhadas por nanoestruturas e nanopartículas poliméricas, como tamanhos nanométricos, grande área de superfície e alta reatividade, podem apresentar um risco a saúde humana e a outros organismos. Portanto, mais estudos precisam ser realizados para a avaliação do potencial tóxico de nanopartículas para serem empregados com segurança na indústria alimentícia e farmacêutica (CAMBRUSSI et al., 2018).

Entre alguns fatores que podem causar riscos à saúde humana está o estresse oxidativo, que se caracteriza por ser um desequilíbrio entre o acúmulo e a remoção de radicais livres. Esse desequilíbrio pode ocorrer devido à diminuição da atividade das enzimas antioxidantes endógenas essenciais ou então ao acúmulo de espécies reativas de oxigênio (EROs) (LIAQUAT et al., 2018). Os antioxidantes endógenos, que são produtos do metabolismo do próprio organismo, podem ser classificados em enzimáticos ou não enzimáticos (MIROŃCZUK-CHODAKOWSKA; WITKOWSKA; ZUJKO, 2018). Entretanto, o sistema colinérgico é constituído por células nervosas que utilizam o neurotransmissor acetilcolina (ACh) para a transmissão do potencial de ação (TRIVEDI et al., 2017). A colinesterase animal é uma classe de enzima presente em diversos tecidos, bem como no plasma e em outros fluidos corporais. Elas são divididas em duas classes, dependendo de sua especificidade e suscetibilidade ao inibidor acetilcolinesterase (colinesterase verdadeira; AChE) e butirilcolinesterase (pseudocolinesterase; BChE) (BEGUM et al., 2018). A acetilcolina, atua como uma molécula fundamental para a consolidação da memória e o comportamento de aprendizagem que governa a sobrevivência neuronal. O desequilíbrio nos níveis de ACh devido a alteração nos genes envolvidos na síntese, transporte e degradação causa disfunção colinérgica (TRIVEDI et al., 2017).

Técnicas para a determinação da toxicidade de compostos vêm sendo utilizados principalmente com animais vertebrados, entretanto o uso de modelos alternativos vem substituindo com bastante eficiência e inúmeras vantagens, dentre elas o baixo custo. As *Drosophila melanogaster* ou mosca da fruta são reconhecidas como um organismo modelo, importantes para a avaliação da toxicidade ou benefício de vários

produtos químicos, incluindo aqueles derivados a partir de plantas (KLIMACZEWSKI et al., 2018).

Devido aos escassos trabalhos na literatura que abordam sobre a nanotoxicidade da curcumina obtida por miniemulsificação/evaporação e utilizando modelos animais alternativos como a *Drosophila melanogaster* nota-se essa ser uma importante área de pesquisa a ser investigada a partir de tratamentos *in vivo* e *ex vivo*.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Produzir e caracterizar nanopartículas de curcumina em matriz PCL e avaliar a nanotoxicidade utilizando *Drosophila melanogaster* como um modelo biológico alternativo.

2.2 Objetivos Específicos

- Produzir nanopartículas de curcumina utilizando policaprolactona (PCL) como agente encapsulante pela técnica da miniemulsificação/evaporação;
- Caracterizar as nanopartículas pelas técnicas de Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET), Difração Dinâmica da Luz (DLS), Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC), Espectrofotometria no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) e Difração de Raios-X (DRX);
- Avaliar a partir de testes *in vivo*, o efeito das nanopartículas de curcumina na Dose Letal (DL₅₀), na curva de sobrevivência, no teste da geotaxia negativa, teste base-topo e do campo aberto em *Drosophila melanogaster*;
- Determinar em testes *ex vivo* as atividades das enzimas colinérgicas (AChE e BChE) e antioxidantes (CAT e grupos tióis) em tecidos de *Drosophila melanogaster*.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 COMPOSTOS BIOATIVOS

Compostos bioativos são antioxidantes naturais que apresentam benefícios na prevenção e no tratamento de doenças metabólicas, degenerativas e cardiovasculares. Estes compostos estão presentes em fontes vegetais como frutas, verduras, raízes e leguminosas (SHISHIR et al., 2018). No entanto, compostos bioativos naturais são em sua grande maioria hidrofóbicos (BAZANA; CODEVILLA; DE MENEZES, 2019), quimicamente instáveis e suscetíveis à degradação oxidativa, particularmente quando expostos ao oxigênio, luz, umidade e calor. A degradação oxidativa pode deteriorar compostos fenólicos levando à geração de radicais livres e desenvolvimento de sabores e odores desagradáveis, e subsequentemente pode resultar em um efeito negativo na estabilidade de prateleira em alimentos, características sensoriais e aceitação do produto pelo consumidor (SHISHIR et al., 2018).

3.2 CURCUMINA

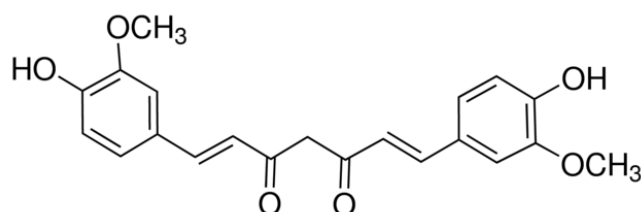
Ao longo das últimas décadas, tem sido possível observar grande interesse pelo potencial terapêutico de certas plantas, podendo ser evidenciado pelo fato de que cerca de 30% dos medicamentos prescritos no mundo são obtidos direta ou indiretamente a partir de plantas (CARLOS et al., 2009). Apesar do imenso progresso no campo da química orgânica, 25% de todos os medicamentos prescritos atualmente para tratar os tipos metastáticos de doença neoplásica são derivados de fontes naturais, dos quais mais de 80% são compostos derivados de plantas (MIRAKABAD et al., 2016).

Nos últimos anos, a curcumina ganhou atenção significativa tanto em pesquisas farmacológicas (CHAHARBAND et al., 2018) quanto para o desenvolvimento de alimentos funcionais e novos produtos alimentícios enriquecidos com curcumina (RAFIEE et al., 2018), devido à sua ampla gama de propriedades funcionais promotoras de saúde (ADEDARA et al., 2015; ARAIZA-CALAHORRA; AKHTAR; SARKAR, 2018; CAKA et al., 2017; HUMINIECKI; HORBAŃCZUK; ATANASOV, 2017). Tais propriedades funcionais da cúrcuma, vem sendo relacionadas principalmente pelos seus compostos ativos únicos chamados curcuminóides (RAFIEE et al., 2018). A cúrcuma longa é composta por 3% a 5% de curcuminóides, sendo os quatro tipos principais:

curcumina (77%), demetoxicurcumina (17%), bisdemetoxicurcumina (3%) e ciclocurcumina (ARAIZA-CALAHORRA; AKHTAR; SARKAR, 2018). No entanto, acredita-se que a curcumina seja o fotoquímico mais ativo isolado do rizoma da *Curcuma longa* (LIANG; FRIEDMAN; NACHARAJU, 2017; MATHEW; HSU, 2018).

A *Curcuma longa* (*Zingiberaceae*) caracteriza-se por ser uma planta perene herbácea tuberosa que apresenta flores amarelas e folhas largas, que é um membro da família do gengibre e cresce em clima tropical. (KOCAADAM; ŞANLIER, 2017; RAFIEE et al., 2018). A curcumina (Figura 1) com denotação química [1,7-bis-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-hepta-1,6-dieno-3,5-diona] e fórmula química $C_{21}H_{20}O_6$ (KOCAADAM; ŞANLIER, 2017) é um composto polifenólico de baixo peso molecular ($368,37 \text{ g mol}^{-1}$) com ponto de fusão de 183°C (ARAIZA-CALAHORRA; AKHTAR; SARKAR, 2018; LIANG; FRIEDMAN; NACHARAJU, 2017), hidrofóbico, lipofílico, apresenta uma coloração laranja - amarelada que constitui a 2-5% de açafrão em pó (KOCAADAM; ŞANLIER, 2017), comumente utilizada como especiaria na Índia (CAKA et al., 2017). A curcumina, apresenta baixa solubilidade em água, tem taxa de dispersão insuficiente em meio aquoso (RAFIEE et al., 2018) e insolúvel em pH ácido e neutro (KOCAADAM; ŞANLIER, 2017), apresentando ainda como fator limitante, degradação sob processamento (luz, calor, oxigênio e íons metálicos) e interação com outros componentes alimentares (RAFIEE et al., 2018). Apesar disso, apresenta solubilidade em acetona, metanol e etanol (KOCAADAM; ŞANLIER, 2017; RAFIEE et al., 2018).

Figura 1. Estrutura química da curcumina.



Fonte: Sigma-Aldrich (2020).

Estudos apontam a curcumina como um antioxidante natural não tóxico (AGARWAL; GOEL; BEHARI, 2010) com atividades terapêuticas contra várias doenças, como diabetes, inflamações, esclerose múltipla, doença de Alzheimer (CHAHARBAND et al., 2018; MOHAMED et al., 2017). Além disso, apresenta atividade antimicrobiana, cicatrizante e potencial anticancerígeno demonstrados em estudos *in vitro* (CAKA et al., 2017; LIANG; FRIEDMAN; NACHARAJU, 2017; MIRAKABAD et al., 2016).

Devido à sua baixa absorção pelo organismo, alta velocidade de metabolismo e alta eliminação pelo corpo, a curcumina tem uma baixa biodisponibilidade, a qual limita significativamente os efeitos terapêuticos desse componente (KOCAADAM; ŞANLIER, 2017; MOHAMED et al., 2017). Todavia, métodos alternativos estão sendo propostos afim de contornar estas deficiências (KOCAADAM; ŞANLIER, 2017). Sistemas de entrega nanométricos para a curcumina, abrangendo nanopartículas poliméricas biodegradáveis (MIRAKABAD et al., 2016), transportadores poliméricos, dispersões sólidas, nanopartículas lipídicas e emulsões podem favorecer novas formulações que apresente maior circulação, melhor permeabilidade e resistência aos processos metabólicos (MOHAMED et al., 2017).

3.3 NANOTECNOLOGIA

A nanotecnologia é um campo da ciência que vem sendo estudada cada vez mais em escala global, e tem sido evidente o impacto em todas as áreas da ciência e tecnologia, sendo considerada inovadora e de alto potencial (KUMARI; YADAV, 2014; RAFIEE et al., 2018). Esta técnica baseia-se no micro e nanoencapsulamento, em que ambos tem característica em melhorar a funcionalidade do produto (SHISHIR et al., 2018), reduzindo aspectos limitantes de compostos bioativos, como aumento da solubilidade, estabilidade, diminuição dos efeitos indesejáveis sobre atributos sensoriais dos alimentos e fornecimento de nutrientes diretamente às células, aumentando assim, sua bioatividade e biodisponibilidade (JAFARI; MCCLEMENTS, 2017; KUMARI; YADAV, 2014; RAFIEE et al., 2018; SHISHIR et al., 2018).

A produção da micro e/ou nanocápsulas baseia-se no revestimento do composto ativo, que são também denominados como núcleo, enchimento ou fase interna, enquanto que o polímero de revestimento (material transportador) são conhecidos como material de parede, membrana, cápsula, casca, matriz ou fase externa (SHISHIR et al., 2018). As nanopartículas podem ser revestidas com moléculas que camuflam a hidrofobicidade do composto encapsulado, fornecendo uma camada hidrofílica em sua superfície (MIRAKABAD et al., 2016).

No processo de encapsulamento, é necessário avaliar qual o método e o tipo de sistema encapsulante é o mais adequado para o encapsulamento do composto ativo. A curcumina por exemplo, é bem encapsulada em lipídios por emulsificação. Resumidamente, duas coisas são geralmente necessárias, a seleção de materiais

encapsulantes para o preparo de um sistema encapsulado adequado e a técnica de encapsulamento a ser empregada (SHISHIR et al., 2018).

3.4 TECNICAS DE NANOENCAPSULAÇÃO

Métodos distintos para o preparo de nanopartículas têm sido descritos na literatura, dentre eles, a polimerização em emulsão em fase aquosa contínua, polimerização em emulsão em fase orgânica contínua, polimerização interfacial, disposição interfacial e evaporação do solvente (WOODRUFF; HUTMACHER, 2010).

O método de emulsificação/evaporação do solvente tem sido muito utilizado para o preparo de partículas esféricas biodegradáveis, por apresentar um método que requer condições suaves, como temperatura ambiente e agitação constante. Portanto, as emulsões estáveis podem ser formuladas sem comprometer a atividade das substâncias encapsuladas (ZAFAR et al., 2017). Além disso, este modelo é considerado eficiente para aplicação em compostos hidrofóbicos como é o caso da curcumina (CODEVILLA et al., 2015). Essa técnica consiste em três etapas, o polímero pré-formado é dissolvido em uma fase orgânica composta por solvente e o composto a ser encapsulado, enquanto a fase aquosa consiste em água destilada. Um único tensoativo ou uma mistura é adicionado na fase orgânica ou na fase aquosa, conforme necessário. A fase orgânica é então dispersa na fase aquosa sendo necessária uma fonte de energia de alta eficiência, tal como um sonicador. Na terceira etapa, o solvente é então removido por extração ou evaporação e a nanopartícula é formada. Com a diminuição da quantidade de solvente, as nanopartículas são formadas em função da diminuição da solubilidade do polímero no solvente e sua consequente precipitação (CODEVILLA et al., 2015; LEIMANN et al., 2015).

3.5 ENCAPSULANTES POLIMÉRICOS

Os polímeros biodegradáveis são caracterizados pela capacidade em serem degradados no meio ambiente por ação de microrganismos em um período de tempo curto (semanas ou meses sob condições favoráveis), estes materiais vêm despertando interesse científico e tecnológico (BEZERRA et al., 2017). Alguns dos polímeros biodegradáveis que vem sendo utilizados na produção de partículas são, poli (orto

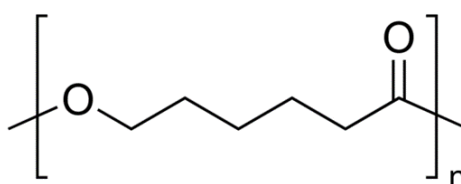
ésteres), polianidridos, polissacarídeos, polifosfazenos e os poliésteres (ZAFAR et al., 2017).

3.5.1 Policaprolactona

A policaprolactona (PCL) é um poliéster alifático sintético facilmente biodegradável (CAMPOS; MARCONATO; FRANCHETTI, 2010; KATSOGIANNIS; VLADISAVLJEVIĆ; GEORGIADOU, 2015). Este polímero semicristalino hidrofóbico, apresenta um ponto de fusão (T_m) entre 59-64 °C, dependendo do conteúdo cristalino, e uma temperatura de transição vítrea (T_g) entorno de -60 °C (CAMPOS; MARCONATO; FRANCHETTI, 2010), sua cristalinidade tende a diminuir com o aumento do peso molecular. A boa solubilidade deste polímero, seu baixo ponto de fusão e excelente compatibilidade com mistura estimulou pesquisas sobre sua aplicação (WOODRUFF; HUTMACHER, 2010). O PCL é degradado pela hidrólise de suas ligações éster em condições fisiológicas semelhantes ao do corpo humano e, portanto, recebeu muita atenção pelo uso na administração de medicamentos. Em particular, é especialmente interessante para a preparação de dispositivos implantáveis a longo prazo, devido à sua degradação mais lenta em relação a outros polímeros (KUMARI; YADAV; YADAV, 2010).

O PCL tem como características a tenacidade, flexibilidade e boa compatibilidade com vários outros polímeros (BEZERRA et al., 2017).

Figura 2. Estrutura química da Policaprolactona



Fonte: Sigma-Aldrich (2020).

3.6 TOXICIDADE

Todas as substâncias são potencialmente tóxicas quando administradas em doses suficientemente altas (HAMM et al., 2017) e as intoxicações podem ocorrer de modo agudo ou crônico. O primeiro caso geralmente ocorre após um único contato, já a

intoxicação crônica ocorre por contato continuado (CAMPOS et al., 2016). A toxicidade pode ser dependente de fatores relacionados a condições como estocagem do material, a dose utilizada, a forma de uso e interações entre compostos (CAMPOS et al., 2016; HOLMES; CRETON; CHAPMAN, 2010).

Testes de toxicidade caracterizam-se por identificarem o potencial de uma determinada substância em causar efeitos adversos após a exposição/administração a uma dose única, onde os efeitos adversos ocorridos em determinado intervalo de tempo são analisados (STRICKLAND et al., 2018). Várias agências reguladoras usam dados de toxicidade sistêmica aguda para classificação e rotulagem de produtos que alertam manipuladores e consumidores sobre possíveis riscos de toxicidade, estes dados também são usados para determinar limites aceitáveis de exposição humana (HAMM et al., 2017; STRICKLAND et al., 2018).

Os testes tradicionais *in vivo* comumente incluídos nas diretrizes de teste regulatório geram uma DL₅₀, que é a dose que produz letalidade em 50% dos animais testados (HAMM et al., 2017). O teste DL₅₀ foi introduzido pela primeira vez em 1927 por Trevan a fim de testar substâncias destinadas ao uso humano, entretanto, tornou-se obrigatório na década de 70. O DL₅₀ consiste em encontrar a dose letal única de uma substância que mata metade dos animais em um grupo de teste, este, tornou-se geralmente aceito como base para comparar e classificar as toxicidades de produtos químicos e gradualmente se tornou um teste obrigatório para vários órgãos reguladores preocupados com novos medicamentos, aditivos alimentares, ingredientes cosméticos, produtos domésticos, produtos químicos industriais e pesticidas (BOTHAM, 2004).

A exposição à um produto químico não significa automaticamente que toda essa dose estará biodisponível. A toxicocinética fornece um meio de avaliar a relação entre a exposição sistêmica de um produto químico e quaisquer metabólitos e sua toxicidade. Esses dados ajudam a entender a relação entre toxicidade observada e dose administrada, fornecendo informações valiosas para avaliação de riscos (HOLMES; CRETON; CHAPMAN, 2010).

3.6.1 Nanotoxicidade

Apesar da popularidade e um aumento acelerado na fabricação e uso de nanopartículas (NPs), o pouco conhecimento sobre os possíveis efeitos negativos a longo prazo a saúde humana e ao meio ambiente fez com que suas aplicações fossem

restritas tornando-se uma preocupação social (CABALLERO-DÍAZ; VALCÁRCEL CASES, 2016; KHANNA et al., 2015; SUNDARARAJAN et al., 2019). A nanotoxicologia inclui o estudo da toxicidade dos nanomateriais para melhor compreensão e avaliação dos riscos à saúde envolvidos no uso de nanopartículas (KHANNA et al., 2015).

O estudo da nanotoxicidade pode ser explicado em etapas de avaliações, onde a caracterização bem definida das NPs é considerada um estudo preliminar com o objetivo de correlacionar a respostas biológicas. A seguir, testes *in vitro* são aplicados utilizando células para avaliar o efeito tóxico das NPs a nível celular. Posteriormente, avaliações *in vivo* são consideradas, onde tem-se respostas biológicas induzidas pela exposição às NPs que são realizados utilizando animais modelo (CABALLERO-DÍAZ; VALCÁRCEL CASES, 2016).

As propriedades físico-químicas das nanopartículas favorecem o aumento dos efeitos colaterais toxicológicos, como tamanho, forma e química da superfície (KHANNA et al., 2015; SUNDARARAJAN et al., 2019). Em especial, o tamanho das partículas e a área de superfície são considerados fatores importantes que contribuem direta e significativamente para a toxicidade das nanopartículas. Nanopartículas de tamanho menor tendem a apresentar efeitos tóxicos mais altos devido ao aumento da área de sua superfície (KHANNA et al., 2015; SHIN; SONG; UM, 2015).

Devido a este aumento na demanda por nanopartículas, tem-se um aumento significativo na diversidade química das mesmas as quais interagem com sistemas biológicos e os tornam incapazes de uma análise toxicológica padrão. Deste modo, vias conhecidas de nanotoxicidade, incluindo a ruptura da integridade da membrana celular, danos no DNA e estresse oxidativo, são avaliados. Também podem ser utilizados métodos analíticos adaptados com origens nas ciências químicas (espectroscopia, espectrometria de massa e métodos eletroquímicos) e as ciências biológicas (genômica, proteômica e metabolômica) para avaliar a resposta de sistemas biológicos expostos a nanomateriais (GUNSOLUS; HAYNES, 2016).

3.7 *Drosophila melanogaster* (DM)

Há muito tempo, animais vem sendo utilizados para experimentos, testes de drogas e rastreios toxicológicos, a fim de desenvolver novos tratamentos que beneficiem a sociedade (DOKE; DHAWALE, 2015). No entanto, estes experimentos científicos podem causar dor, angústia e morte destes animais, o que vem sendo questionado e

debatido há anos. Além da questão ética, outras desvantagens são evidenciadas ao uso de certos animais como, por exemplo, a exigência de mão de obra qualificada, protocolos demorados e altos custos com reprodução e alojamento (DOKE; DHAWALE, 2015; SARTORETTO et al., 2016). Afim de superar estas desvantagens, outras alternativas vêm sendo buscadas, uma estratégia reconhecida como 3 Rs vem sendo aplicada, visando a “redução” no número total de animais utilizado em um experimento, o “refinamento” desse uso que requer um planejamento cuidadoso de tal maneira que se possa minimizar sofrimentos e a “substituição” de animais superiores por metodologias alternativas com uso de organismos inferiores (ADEDARA et al., 2015; DE JONG, 2019; DOKE; DHAWALE, 2015).

A DM, também conhecida como mosca da fruta (ARYAL; LEE, 2019), é bastante utilizada como um organismo modelo para estudos de nanotoxicidade (SUNDARARAJAN et al., 2019), doenças infecciosas, atividade mutagênica, desordens neurodegenerativas (doença de Alzheimer, diabetes, câncer) (DAN et al., 2019) e para testes com diversos compostos (SABAT et al., 2016). A literatura afirma que esta vem sendo usada na ciência biológica há mais de 100 anos. O conceito de que características hereditárias são carregadas nos cromossomos foi desenvolvido pela primeira vez na mosca, assim como muitas outras descobertas marcantes na genética (PANDEY; NICHOLS, 2011).

A DM tem muitas propriedades biológicas, fisiológicas e neurológicas básicas conservadas em comum aos seres humanos (DAN et al., 2019; PANDEY; NICHOLS, 2011; SABAT et al., 2016; SUNDARARAJAN et al., 2019), possuem todo genoma sequenciado e quase 75% dos genes encontrado em doenças de humanos tem sequencias similares ou idênticas em DM (DAN et al., 2019; SABAT et al., 2016).

A utilização das moscas como modelo biológico apresentam inúmeras vantagens associadas a suas propriedades, como um ciclo curto de crescimento até a idade adulta de 10-12 dias à temperatura ambiente, podendo ser facilmente mantidas em frascos contendo uma dieta de baixo custo comercial contendo farinha de milho (SUNDARARAJAN et al., 2019). Possui sensibilidade a substâncias tóxicas e é considerado um bioindicador para detectar ações biológicas de agentes farmacológicos, sendo bastante utilizado nos últimos anos em estudos genéticos e toxicológicos (ADEDARA et al., 2015; GOLOMBIESKI et al., 2008). Além disso, o Centro Europeu para Validação de Métodos Alternativos (ECVAM) recomenda o uso desses animais para promover os 3Rs (redução, refinamento e substituição) em estudos e testes de

toxicidade em animais de laboratório (ADEDARA et al., 2015), deste modo, seu uso apresenta menor discussão ética em relação a estudos genéticos quando comparados a outros modelos vivos de análise. (DAN et al., 2019; SABAT et al., 2016; SUNDARARAJAN et al., 2019).

3.8 SISTEMAS COLINÉRGICOS

O sistema colinérgico regula vários aspectos da função cerebral, incluindo o processamento sensorial, atenção, sono, aprendizagem, memória e excitação, bem como a modulação da atividade neural via receptores de acetilcolina (JIANG; GAO; TURDU, 2017; LI et al., 2018; SCHLIEBS; ARENDT, 2011). A neurotransmissão colinérgica incentivou vários pesquisadores a formularem a hipótese colinérgica para diversas funções e disfunções cerebrais, a qual sugere uma forte relação com funções cognitivas e da demência (CONTESTABILE, 2011). Deste modo, acredita-se que o restabelecimento da função colinérgica possa reduzir a gravidade da perda cognitiva (DUMAS; NEWHOUSE, 2011).

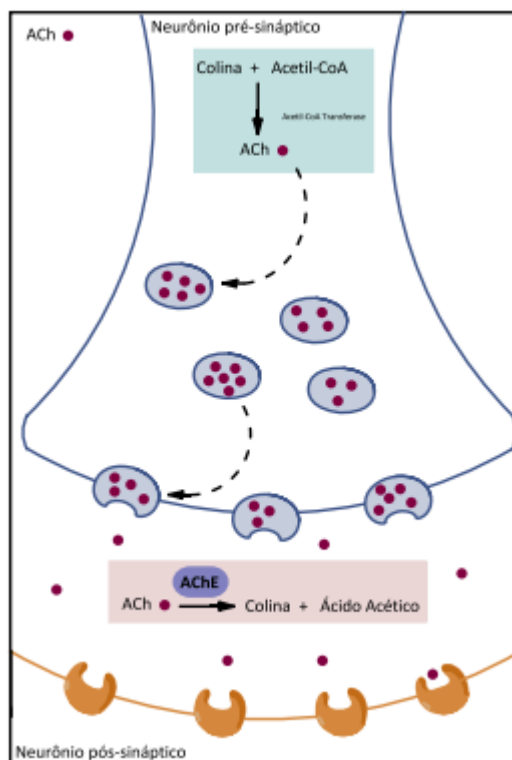
O sistema colinérgico cerebral é formado por uma extensa rede de neurônios de projeção, que inervam várias áreas do cérebro. Estes neurônios são definidos colinérgicos por conterem o mecanismo para sintetizar e liberar ACh para neurotransmissores (PEPEU; GRAZIA GIOVANNINI, 2017).

Existem dois tipos de colinesterases: a butirilcolinesterase (BChE, E.C.3.1.1.8) também conhecida por colinesterase plasmática devido estar presente em sua maioria no plasma sanguíneo e a acetilcolinesterase (AChE, E.C.3.1.1.7) que se encontra abundantemente no sistema nervoso central, nos músculos esqueléticos e na membrana dos eritrócitos. Apesar destas colinesterases serem semelhantes em suas estruturas, elas diferenciam-se por sua distribuição nos tecidos, por suas propriedades cinéticas e pela especificidade para com seus substratos (ARAÚJO; SANTOS; GONSALVES, 2016). No entanto, assim como a AChE, a BChE também é capaz de inativar o neurotransmissor ACh e é, portanto, um alvo terapêutico viável para algumas doenças degenerativas (DHOUIB et al., 2017).

A ACh é considerada um neurotransmissor que participa das sinapses colinérgicas nos sistemas nervoso central (SNC) e periférico (SNP) (ARAÚJO; SANTOS; GONSALVES, 2016; FUJII et al., 2017) com atividade em todo o córtex, nos gânglios da base e no prosencéfalo basal (HAMPEL et al., 2018). Ela exerce uma tarefa essencial

na remodelação estrutural e funcional dos circuitos corticais, estabelecendo contatos sinápticos em redes de células que auxiliam funções cognitivas complexas na idade adulta e que podem sofrer alterações degenerativas ao longo da idade (envelhecimento) (SCHLIEBS; ARENDT, 2011). A Figura 3 esquematiza os principais passos na síntese, liberação e recepção do neurotransmissor ACh.

Figura 3. Fisiologia da sinapse colinérgica.



Fonte: (ARAÚJO; SANTOS; GONSALVES, 2016)

A colina presente no plasma é captada pelos neurônios colinérgicos a partir de um transportador sódio-colina. A ACh é sintetizada a partir da acetil-coenzima A (Ac CoA) e colina por meio de uma reação catalisada por uma enzima colina acetiltransferase (ChAT). A ACh é empacotada em vesículas por meio de transportadores vesiculares de ACh, onde precisará de um estímulo que vem em forma de potencial de ação para ser liberada, desta forma, ao sofrer um estímulo, a vesícula se funde à membrana pré-sináptica, liberando a ACh na fenda sináptica. Uma vez que o neurotransmissor ACh é liberado na sinapse, liga-se (ativa) ao receptor pós-sináptico (M1), transmitindo assim um sinal de um neurônio para o outro. O excesso de neurotransmissor na fenda sináptica é hidrolisado pela AChE, em colina e acetato, que

são devolvidos por um mecanismo de captação para reciclagem em acetil-coenzima A (ARAÚJO; SANTOS; GONSALVES, 2016; HAMPEL et al., 2018).

Muitos estudos direcionados à modulação destas enzimas colinérgicas vem sendo desenvolvidos, afim de investigar meios de inibir a atividade da AChE utilizando diferentes compostos, seja por meio da indução da toxicidade ou não, para os quais, faz-se uso de espécies de moscas como a DM (AKINYEMI et al., 2018; SÁ et al., 2019). Silva de Sá et al. (2019) pesquisaram o efeito das nanopartículas de curcumina em concentrações de 10 a 100 μM dissolvidos em água sobre a atividade da AChE e BChE em tecidos de moscas da espécie DM. Os autores constataram que a curcumina produzida a partir da dispersão sólida diminuiu a atividade da AChE nas concentrações de 25 e 50 μM . Para a BChE a inibição da atividade foi constatada em 100 μM . Estes resultados demonstram uma maior interação do composto com o alvo, quando comparados aos resultados da curcumina pura dissolvida em água para o mesmo teste.

3.9 ESTRESSE OXIDATIVO

Organismos aeróbicos produzem espécies reativas de oxigênio (EROs) como consequência da respiração e da oxidação de substratos. Baixos níveis de EROs são de suma importância para as células por participarem de muitos processos bioquímicos. Em contrapartida, sua alta concentração leva ao chamado estresse oxidativo, podendo causar prejuízos severos a célula e até morte celular (MATÉS, 2000; MATÉS; PÉREZ-GÓMEZ; DE CASTRO, 1999; YANG; LEE, 2015).

A espécies reativas de oxigênio (EROs) compreendem substâncias tóxicas contendo um ou mais átomos de oxigênio ativo, resultantes da redução do oxigênio (ARAÚJO et al., 2018). Estas substâncias reativas estão divididas em grupos de radicais livres e compostos não radiculares. Na forma de radicais livres, temos por exemplo, $\text{OH}\cdot$ (íon hidroxila), $\text{HOH}\cdot$ (íon peroxil), $\text{O}_2\cdot^-$ (ânion superóxido), NO (óxido nítrico) e O_2 (oxigênio molecular) e os radicais não livres, peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e ácido hipocloroso (HOCl) (DEMIDCHIK, 2015; FERREIRA; MATSUBARA, 1997; MARTELLI; NUNES, 2014; PISOSCHI; POP, 2015; SITI; KAMISAH; KAMSIAH, 2015; YARIBEYGI; ATKIN; SAHEBKAR, 2019).

Radicais livres são espécies químicas com capacidade de existência independente e que contêm elétrons não pareados na órbita externa (DEMIDCHIK, 2015; PISOSCHI; POP, 2015). Estes elétrons desemparelhados, permitem a estes

radicais se ligarem a seus alvos biológicos, como DNA, proteínas e lipídeos ocasionando o dano (YARIBEYGI; ATKIN; SAHEBKAR, 2019). Alguns não possuem átomos de oxigênio como, por exemplo, metais de transição ou radicais centrados em carbono, embora tanto as EROs quanto os radicais livres promovam o estresse oxidativo via oxidação de compostos celulares (DEMIDCHIK, 2015).

O estresse oxidativo pode ser entendido como um estado de desequilíbrio entre o surgimento de espécies reativas de oxigênio (EROs) e a capacidade do organismo em neutralizar sua ação por meio de sistemas de proteção antioxidante (PISOSCHI; POP, 2015; SITI; KAMISAH; KAMSIAH, 2015).

Quando a célula recebe estímulos adversos desequilibrando suas funções fisiológicas, um aumento na demanda por energia para manter o equilíbrio é requerido resultando em um aumento na taxa de respiração. Este aumento metabólico, desencadeia uma superprodução de radicais livres gerando espécies reativas de oxigênio (SAMARGHANDIAN et al., 2017). Quando a geração de EROs é aumentada ou há um decaimento da capacidade de proteção antioxidante pela redução da capacidade dos sistemas endógenos contra o ataque oxidativo direcionado para biomoléculas alvo, pode ocorrer danos à célula associados a várias patologias como as cardiovasculares, câncer, envelhecimento e doenças neurodegenerativas (PISOSCHI; POP, 2015).

O SNC e principalmente o cerebelo são suscetíveis ao estresse oxidativo por apresentarem alta taxa de consumo de oxigênio, altos níveis de ácidos graxos poliinsaturados e relativamente baixo teor de enzimas antioxidantes (DHOUIB et al., 2017). Acredita-se, que um rigoroso esforço dos organismos vivos é necessário para manter a homeostase redox em rígida regulação através de um competente sistema de antioxidantes da membrana celular (YANG; LEE, 2015).

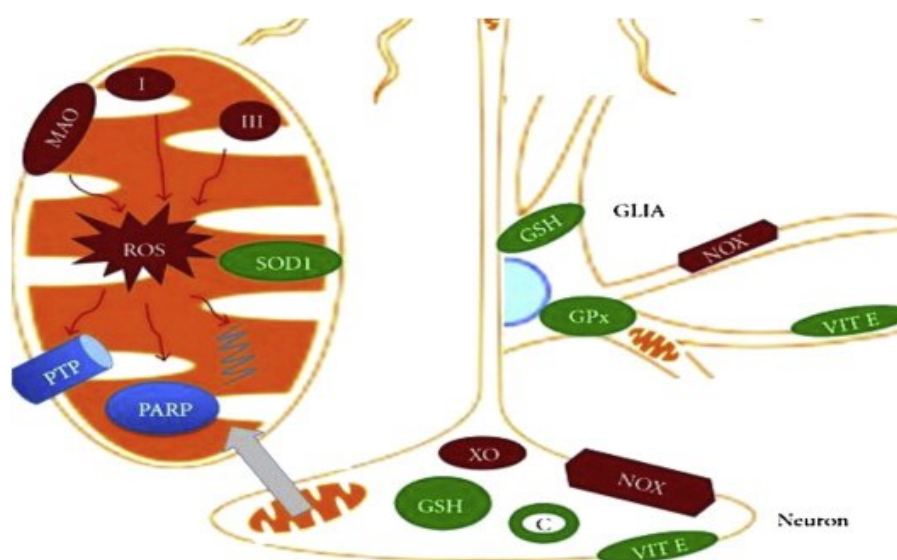
Estudos apontam uma evolução na melhoria aos danos oxidativos após ingestão dietética ou ingestão suplementar de antioxidantes naturais (DAVEREY; AGRAWAL, 2016). Além disso, resultados promissores instigam o potencial uso de compostos naturais com efeitos neuroprotetores na atenuação de toxicidade induzida por substâncias tóxicas ambientais, como por exemplo o uso da curcumina (DAVEREY; AGRAWAL, 2016; DHOUIB et al., 2017; SAMARGHANDIAN et al., 2017).

3.10 ENZIMAS ANTIOXIDANTES

Avaliações *in vitro* e em modelos animais com foco na investigação do potencial das enzimas antioxidantes no combate ao estresse oxidativo diretamente ligado ao desequilíbrio redox vêm sendo realizadas a algum tempo (YANG; LEE, 2015).

Dentre as enzimas que atuam em mecanismo de defesa das células afim de neutralizar espécies reativas de oxigênio, destacam-se a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT) e glutaciona peroxidase (GPx) (ARAÚJO et al., 2018; BARBOSA et al., 2010; IGHODARO; AKINLOYE, 2018; MATÉS, 2000; YANG; LEE, 2015). A Figura 4 ilustra os principais produtores de EROs e os principais agentes oxidantes.

Figura 4. Ilustração dos principais produtores de EROS e da defesa antioxidante em neurônios e glia



Fonte : (PISOSCHI; POP, 2015)

Na Figura 4, os produtores de EROs são representados pela monoamina oxidase (MAO), complexo I e complexo III nas mitocôndrias. As EROs formadas em mitocôndrias têm como alvo o poro de transição de permeabilidade (PTP), a polimerase de ribose de polyADP (PARP) e o DNA mitocondrial. NADPH oxidase (NOX) e xantina oxidase (XO) são os principais geradores de EROS no citosol. O sistema de defesa antioxidante compreende: superóxido dismutase (SOD) na mitocôndria, glutaciona (GSH), catalase (C) e glutaciona peroxidase (GPx).

A superóxido dismutase (SOD) (EC1.15.1.1) é uma enzima de organismos que vivem na presença de oxigênio. Estas, catalisam a conversão do superóxido de radical

livre (O_2^{\bullet}) em peróxido de hidrogênio (H_2O_2), espécie menos reativa. O peróxido gerado pode ser neutralizado pela ação da catalase ou glutathione peroxidase (CHUAN et al., 2017; MATÉS, 2000; MATÉS; PÉREZ-GÓMEZ; DE CASTRO, 1999; WANG et al., 2018). A SOD pode ser encontrada no citoplasma onde é dependente de cobre e zinco (SOD-Cu/Zn) como cofatores, enquanto que na mitocôndria, depende do manganês (SOD-Mn) (BARBOSA et al., 2010).

A catalase (CAT) (EC 1.11.1.6) é uma enzima presente em organismos aeróbicos e anaeróbicos que tem como função impedir o acúmulo de peróxido de hidrogênio na célula (KAUSHAL et al., 2018). Esta, participa da reação de decomposição do peróxido de hidrogênio em oxigênio (O_2) e água (H_2O) (GRIGORAS, 2017; KAUSHAL et al., 2018). Esta enzima utiliza ferro ou manganês como cofator, e está presente principalmente nos peroxissomos, mas está ausente nas mitocôndrias das células de mamíferos (IGHODARO; AKINLOYE, 2018). Esse fator implica que, em mamíferos, a presença de peróxido de hidrogênio na mitocôndria seja neutralizada não pela catalase, mas sim pela glutathione peroxidase (GPx) (IGHODARO; AKINLOYE, 2018).

A glutathione peroxidase (GPx) (EC 1.11.1.9) é uma enzima intracelular que atua na hidrólise do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em água, e ainda, peróxidos lipídicos em seus álcoois correspondentes. Tem função principalmente nas mitocôndrias, no entanto, eventualmente atua no citosol (BARBOSA et al., 2010; GRIGORAS, 2017; IGHODARO; AKINLOYE, 2018). Na maioria das vezes, sua atividade depende de um cofator de micronutriente, o selênio (BARBOSA et al., 2010; IGHODARO; AKINLOYE, 2018).

Estudos evidenciam que a curcumina apresenta propriedades protetoras aos neurônios em relação aos danos oxidativos (DAVEREY; AGRAWAL, 2016). Acredita-se que a administração de curcumina protege as células das EROs, além do que é capaz de induzir indiretamente a expressão de proteínas oxidativas como superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), glutathione reductase (GR), glutathione-S-transferase (GST) (SAMARGHANDIAN et al., 2017).

Silva de Sá e colaboradores (SÁ et al., 2019), desenvolveram testes *in vitro* utilizando tecidos de DM para investigar o efeito de nanopartículas de curcumina (concentrações de 3-30 μ M) sobre a enzima antioxidante GST. Notou-se uma diminuição significativa na atividade desta enzima em 3 μ M e 10 μ M. Os resultados observados levaram os autores a acreditar que a curcumina pode influenciar na capacidade antioxidante de algumas enzimas no organismo e que os compostos fenólicos interagem com a GST modulando sua ação.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais

Policaprolactona (PCL) (Sigma-Aldrich), curcumina (>65% de pureza, Sigma-Aldrich), Clorofórmio (Vetec, 99,5%) como solvente da fase orgânica, lecitina de soja (Alfa Aesar) como surfactante e água destilada como meio contínuo foram utilizados na obtenção das nanopartículas. Brometo de Potássio (KBr) (Sigma-Aldrich, padrão espectroscópico) foi utilizado nas análises de Espectroscopia em Infravermelho. 5,5'-ditiobis (2-nitrobenzóico) (DTNB) (98%, Sigma-Aldrich), Tris-HCl (Sigma-Aldrich), iodeto de acetiltiocolina (99%, Sigma-Aldrich), iodeto de butiriltiocolina (Sigma-Aldrich) foram utilizados para os testes das atividades enzimáticas da enzima acetilcolinesterase (AChE) e butirilcolinesterase (BChE) em ensaios *ex vivo*. Corante azul brilhante (Sigma-Aldrich), etanol (99,8%, Neon) e ácido ortofosfórico (85%, Neon) foram utilizados na preparação do reagente Comassie para determinação de proteína nos tecidos utilizados nos ensaios *ex vivo*. Fosfato de potássio monobásico e dibásico (99%, Dinâmica) foram utilizados para preparação do tampão fosfato de potássio (TFK). Metilparabeno (99,0%, Neon) foi utilizado como antifúngico na preparação dos meios para as DM. Os reagentes necessários para o meio de cultura das *Drosophila melanogaster* (ágar, farinha de milho, fermento biológico, leite em pó, sacarose) foram adquiridos em comércio local.

4.2 Preparo das nanopartículas de NP-curcumina

As nanopartículas contendo curcumina foram obtidas por meio da técnica de miniemulsão/evaporação do solvente como descrito previamente por (LEIMANN et al., 2015) com pequenas modificações. Lecitina (0,175 g), PCL (0,3 g) e curcumina (0,0142 g) foram solubilizados na fase orgânica composta por clorofórmio (10 g) sob agitação leve por 5 minutos. Na fase orgânica foi adicionada água destilada (24 g) e assim, mantido em agitação (1000 rpm) durante 3 min. A miniemulsificação foi realizada em banho de gelo utilizando sonicador ultrassônico (Fisher-Scientific Dismembrator 120W com uma ponteira de 1/8") durante 180 segundos a 100% da amplitude em um regime de pulsos (30s ligado, 10s pausa). A miniemulsão foi então transferida e mantida em banho sob agitação em uma incubadora shaker de bancada (Dist) durante 12 h a 30°C para evaporação completa do clorofórmio, resultando em uma dispersão das

nanopartículas em água. Após, o látex foi encaminhado para ultrafreezer (-80°C) (Liotop), em seguida foi liofilizado em liofilizador (L101; Liotop). As amostras foram então armazenadas a 10°C protegidas da luz.

4.3 Caracterização das nanopartículas

A caracterização morfológica das nanopartículas foi realizada utilizando Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET; JEOL modelo JEM 2100, 200 kV). Amostras diluídas em água foram gotejadas em porta-amostras de cobre de 300 mesh cobertas de parlódio e foram secas à temperatura ambiente.

O tamanho médio das partículas e o índice de polidispersão (PDI) foram determinados por Dispersão Dinâmica da Luz (DLS, Malvern Nanosizer) utilizando detecção de retroespalhamento (173°) em amostras sem diluição prévia.

As características térmicas dos compostos (PCL, curcumina, nanopartículas e da mistura física de PCL e curcumina) foram avaliadas por Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC, Perkin Elmer 4000). Cerca de 5 a 10 mg do analito foram alocadas em porta-amostras de alumínio fechados e aquecidos de 0 a 300°C com taxa de aquecimento de 20°C. min⁻¹ e fluxo de nitrogênio de 50 mL.min⁻¹.

As 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 cm⁻¹ entre 4000 e 400 cm⁻¹ obtendo-se os valores de varredura médios de 32 acumulações. Os picos foram normalizados para possibilitar a comparação entre as amostras.

Difração de Raios-X (DRX) foi feita em difratômetro de Raios-X (Bruker, D8 Advance) com faixa de escaneamento entre 3° e 60° (2 θ) em fluxo de 5.9°.min⁻¹ e radiação Cu K α gerado em 40 kV e 35 mA.

Em alguns casos, uma mistura física entre a curcumina e o encapsulante foi obtida pela simples mistura manual desses componentes em cadinho para comparação com as nanopartículas (mantendo a mesma proporção mássica das nanopartículas).

4.4 Análises biológicas

4.4.1 Estoque de moscas

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

4.4.2 Ensaio *in vivo*

4.4.2.1 Taxa de sobrevivência/mortalidade

Para este teste, foram utilizadas moscas jovens (2-3 dias). Primeiro foi feita a sincronização das moscas. Neste procedimento os vidros contendo meio padrão em boas condições de sobrevivência e com maior número de larvas foram separados, todas as moscas vivas contidas no vidro foram removidas, sobrando apenas as larvas. Após a eclosão das larvas (2-3 dias) as moscas ficaram mantidas nos vidros por um período de 2 dias até tornarem-se adultas e então, iniciar os testes. No terceiro dia após a eclosão as moscas foram adormecidas sob refrigeração e 100 moscas (ambos o sexo) foram transferidas para meio de análise (1% de ágar; 1% de levedura; 0,05% de sacarose; 1% de leite em pó; 0,08% de metilparabeno) com concentrações diferentes de nanopartículas contendo curcumina e controle (água, 3; 10; 30; 100 μM) e Curcumina livre e controle (água, 10; 30; 100 μM). 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.

4.4.2.2 Geotaxia negativa

A Geotaxia negativa das moscas foi determinada de acordo com (JIMENEZ-DEL-RIO; GUZMAN-MARTINEZ; VELEZ-PARDO, 2010), sendo que 10 moscas (ambos os gêneros) de cada experimento foram anestesiadas sob refrigeração e então foram

transferidas para um tubo do tipo Falcon de 15 mL (15 cm de comprimento e 1,5 cm de diâmetro). Após 30 minutos, período para a recuperação das DM expostas ao gelo, as moscas foram suavemente batidas para parte inferior do tubo, e o tempo gasto por cada mosca para atingir uma altura de 8 cm foi cronometrada. O procedimento foi repetido 5 vezes por cada grupo em intervalos de 1 minuto. Esta análise foi realizada em moscas suplementadas com controle (água), nanopartículas contendo curcumina (3; 10; 30; 100 μ M) e curcumina livre (10, 30, 100 μ M).

4.4.2.3 Teste Base-Topo

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

4.4.2.4 Teste de campo aberto

Para avaliar o comportamento e a atividade exploratória das moscas, 15 moscas de cada grupo foram mantidas em uma placa de Petri a qual foi dividida em quadrantes de um centímetro quadrado cada (HIRTH, 2012). A atividade e o movimento das moscas foram filmados e avaliados a trajetória resultante para o tempo de 60 s, calculadas de acordo com o número de quadrados cruzados/explorados por cada mosca analisada em cada grupo. Esta análise foi realizada em moscas suplementadas com controle (água), nanopartículas contendo curcumina (3; 10; 30; 100 μ M) e curcumina livre (10, 30, 100 μ M).

4.4.3 Ensaio *ex vivo*

4.4.3.1 Preparação do homogeneizado para as análises biológicas

Após a realização dos testes *ex vivo*, foram separadas 100 moscas por grupo sendo essas sensibilizadas em refrigerador doméstico (4°C) e homogeneizadas manualmente em Tris-HCl (50 mM, pH 7,0) (1:10 mosca/ μ L tampão), centrifugadas a 6.000 rpm por 10 minutos e recolhida uma alíquota do sobrenadante (S1) de cada grupo e armazenada em ultrafreezer vertical (-80° C) para posteriores realizações das análises. Esta análise foi realizada em moscas suplementadas com controle (água), nanopartículas contendo curcumina (3; 10; 30; 100 μ M) e curcumina livre (10, 30, 100 μ M).

4.4.3.2 Determinação de atividade da acetilcolinesterase (AChE)

A atividade da AChE das DM foi determinada espectrofotometricamente através do método modificado de Ellman (1959), com algumas adaptações. O meio da reação foi adicionado de tampão TFK 100 mM (pH 7,5), 5,5'-Dithiobis (ácido 2-nitrobenzóico) (DTNB) 2 mM e a solução de sobrenadante (S1). Foi adicionado o substrato ASCh 8 mM ao meio contendo o S1. A atividade da AChE foi medida através do aumento da absorbância em leitor de placa (Thermo-Plate Reader) em comprimento de onda de 405 nm, com leituras a cada minuto durante 4 minutos. Esta atividade foi expressa em % do controle. Esta análise foi realizada em moscas suplementadas com controle (água), nanopartículas contendo curcumina (3; 10; 30; 100 μ M) e curcumina livre (10, 30, 100 μ M).

4.4.3.3 Determinação de atividade da Butirilcolinesterase (BChE)

A atividade da BChE foi determinada de acordo com o método de Ellman (1959) com modificações. O meio da reação foi adicionado de tampão TFK 100 mM (pH 7,5), 5,5'-Dithiobis (ácido 2-nitrobenzóico) (DTNB) 2 mM e a solução de sobrenadante (S1). Foi adicionado o substrato butirilticolina 8 mM ao meio contendo o S1. A atividade da BChE foi medida através do aumento da absorbância em leitor de placa (Thermo-Plate

Reader) em comprimento de onda de 405 nm, com leituras a cada minuto durante 4 minutos. Esta atividade foi expressa em % do controle. Esta atividade foi expressa em % do controle. Esta análise foi realizada em moscas suplementadas com controle (água), nanopartículas contendo curcumina (3; 10; 30; 100 μM) e curcumina livre (10, 30, 100 μM).

4.4.3.4 Determinação de atividade da catalase (CAT)

A atividade da catalase foi realizada de acordo com (AEBI, 1984) pelo monitoramento do consumo de H_2O_2 através da medida da diminuição da absorbância a 240 nm em equipamento UV-Vis (OceanOptics modelo USB650). A atividade da CAT foi expressa em % do controle. Neste método, foram adicionados em cubeta de quartzo, 1800 μL de TFK 50mM pH 7,0 seguido de 20 μL da amostra (S1). A seguir, zerou-se o equipamento e posteriormente adicionou-se 180 μL de H_2O_2 30% (diluído em TFK 50mM pH 7,0), foi realizado a leitura em 240nm por 3' a cada 15". Esta atividade foi expressa em % do controle. Esta análise foi realizada em moscas suplementadas com controle (água), nanopartículas contendo curcumina (3; 10; 30; 100 μM) e curcumina livre (10, 30, 100 μM).

4.4.3.5 Determinação de grupos tióis

Os grupos tiol protéico e o não protéico foram estimados de acordo com a metodologia de (ELLMAN, 1959). Para análise de tiol não proteico, o sedimento obtido após a centrifugação com ácido tricloroacético (TCA) à 10%, foi suspenso em tampão Tris-HCl 50 mM e pH 8. Para análise de tiol proteico, foram adicionados ácido 5,5-ditiobis-2-nitrobenzólico (DTNB) 10 mM ao sobrenadante. Em ambos os casos, a solução permaneceu em temperatura ambiente por 10 minutos e a leitura foi feita em 405 nm em leitor de placa (Thermo-Plate Reader). Esta atividade foi expressa em % do controle. Esta análise foi realizada em moscas suplementadas com controle (água), nanopartículas contendo curcumina (3; 10; 30; 100 μM) e curcumina livre (10, 30, 100 μM).

4.4.3.6 Determinação da concentração de proteína

A determinação da concentração de proteína foi realizada conforme metodologia de (BRADFORD, 1976). 200 μL de Comassie foi adicionado a 10 μL de tecido homogeneizado (S1) de *Drosophila melanogaster* e a leitura foi realizada em leitor de placas (Thermo-Plate Reader) em um comprimento de ondas de 595 nm após 10 minutos.

4.5 Análise estatística

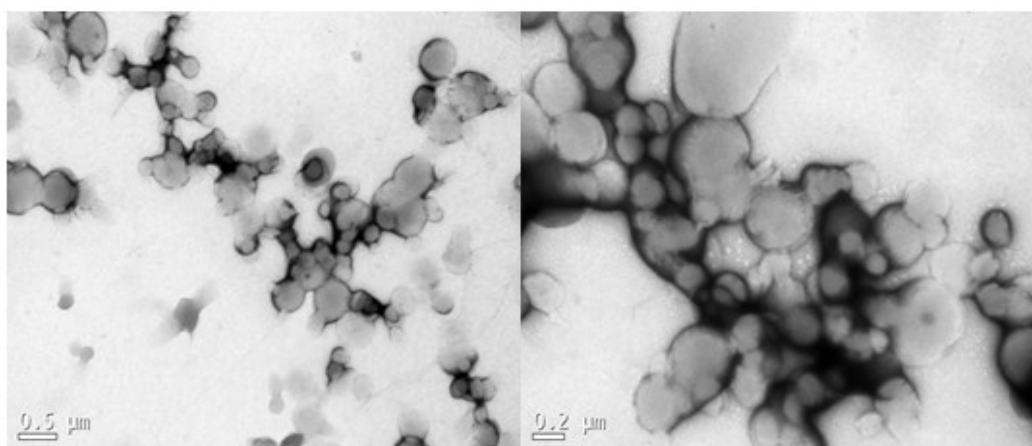
As análises estatísticas foram realizadas no software GraphPad Prism versão 6.0, utilizando teste t-student e ANOVA de uma via ou duas vias ao nível com teste post hoc de Tukey, a um nível de significância de 5%. Os dados foram expressos em média \pm erro padrão. Esta análise foi realizada em moscas suplementadas com controle (água), nanopartículas contendo curcumina (3; 10; 30; 100 μM) e curcumina livre (10, 30, 100 μM).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS

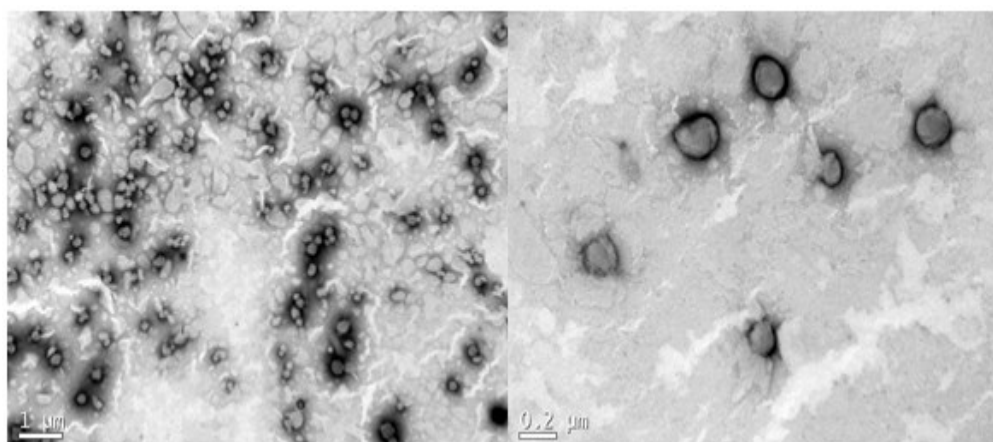
A morfologia das nanopartículas foi observada por Microscopia Eletrônica de Transmissão e as imagens apresentadas nas Figuras 5 e 6 representam as nanopartículas obtidas com PCL sem curcumina (NP-branco) e nanopartículas contendo curcumina (NP-curcumina), respectivamente. Na Figura 7 estão apresentadas as distribuições de tamanho das partículas avaliadas.

Figura 5. Imagens obtidas por Microscopia Eletrônica de Transmissão das nanopartículas branco.



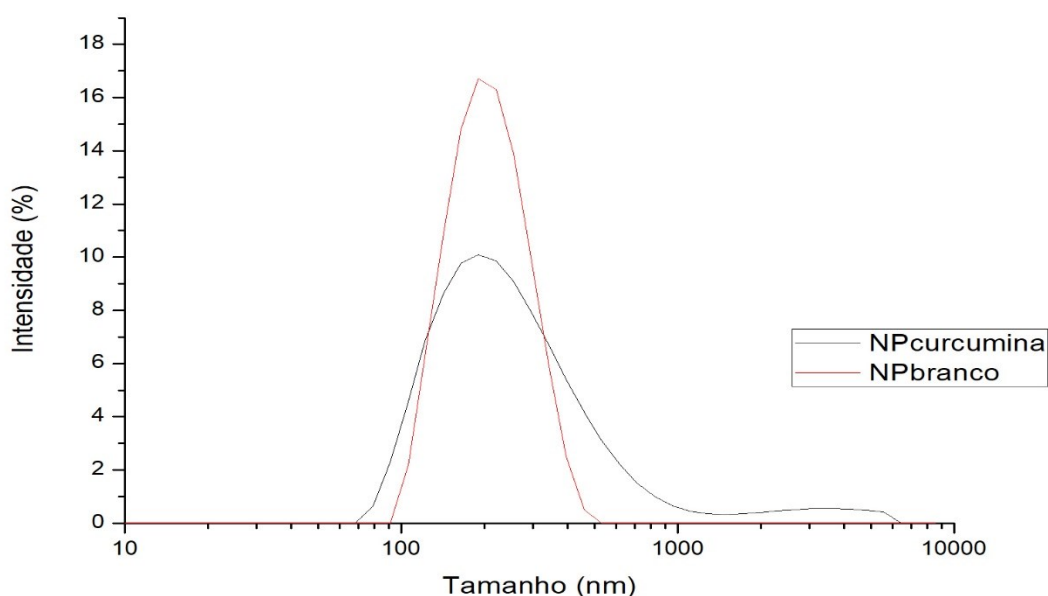
Fonte: Autoria própria (2020).

Figura 6. Imagens obtidas por Microscopia Eletrônica de Transmissão das nanopartículas NP-curcumina.



Fonte: Autoria própria (2020).

Figura 7. Distribuição dos tamanhos das nanopartículas determinados por difração de laser (DLS).

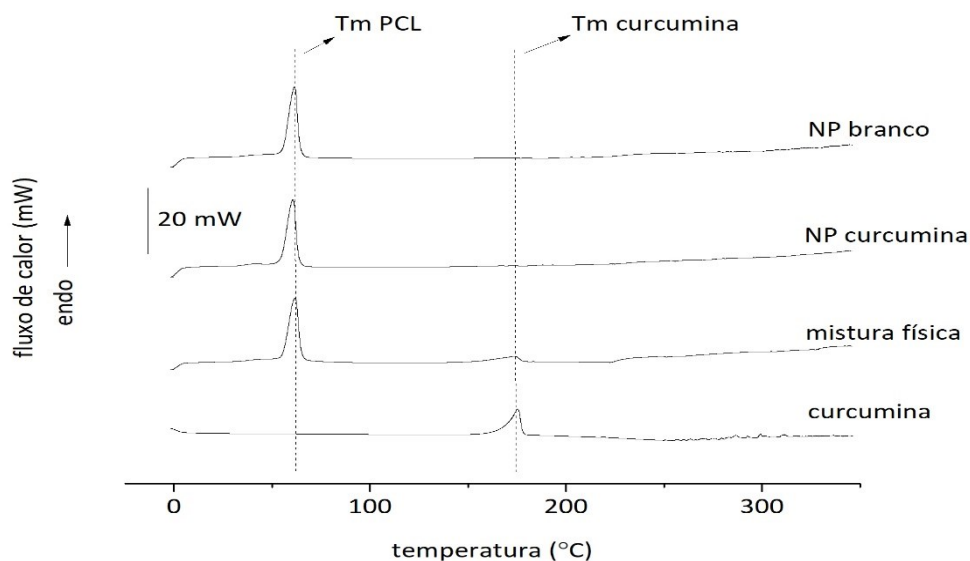


Fonte: Autoria própria (2020).

O Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS), usado para medir a distribuição de tamanhos de partículas em escala nanométrica, demonstrou resultados para diâmetro de intensidade média (D_z) e índice de polidispersão (PDI) iguais a 215 ± 2 nm e $0,24 \pm 0,01$ (adimensional) respectivamente. Este valor para PDI sugere uma distribuição de tamanho uniforme entre as partículas (MASSIMINO; FARIA; YOSHIOKA, 2017). As duas amostras apresentaram morfologia esférica como pode ser observado nas figuras 5 e 6. Além disso, o diâmetro é compatível com o que foi determinado por DLS. Silva-Buzanello et al. (2016) aplicaram o mesmo método para produzir nanopartículas carregadas com curcumina e também obtiveram nanoesferas homogêneas.

A Figura 8 apresenta os termogramas de Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC) para as nanopartículas NP-curcumina, incluindo a mistura física (MF) produzidas na mesma proporção de encapsulante e curcumina encontrada nas partículas.

Figura 8. Curvas de DSC da curcumina, mistura física, NP-curcumina, NP-branco.

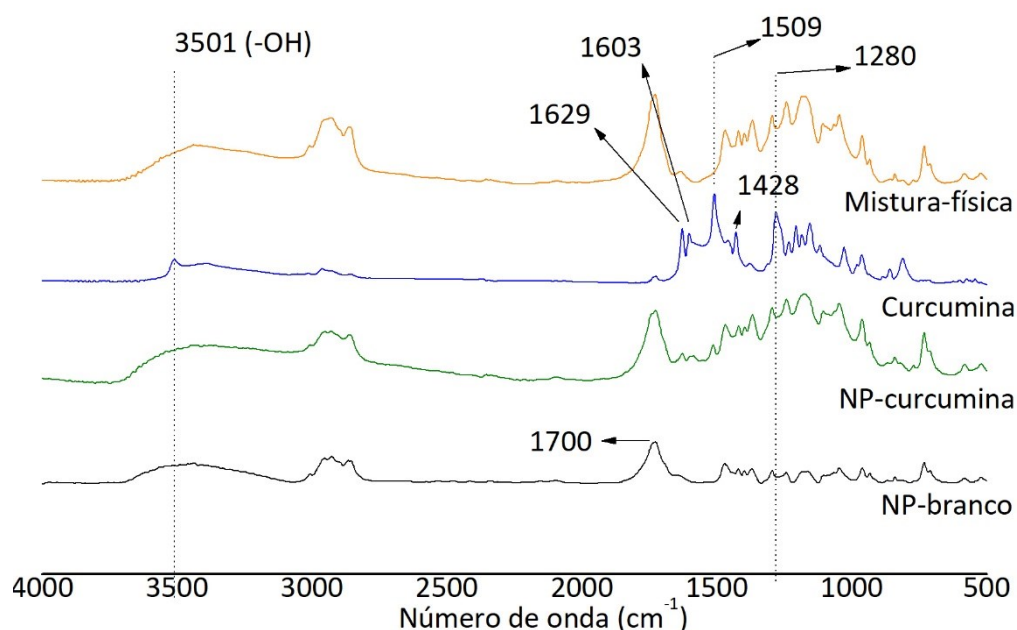


Fonte: Autoria própria (2020).

Nos termogramas apresentados, é possível identificar os picos de fusão do PCL em 61,9°C, enquanto que, o pico de fusão da curcumina, apresentou-se em torno de 173°C de acordo com a literatura (ROCHA et al., 2014), que também foi encontrado na MF de forma atenuada devido à baixa concentração de curcumina na amostra. Contudo, o pico da temperatura de fusão (Tm) da curcumina não pôde ser detectado nas nanopartículas carregadas com curcumina. Este comportamento sugere que a curcumina foi efetivamente encapsulada nas nanopartículas, evidenciando as fortes interações entre o encapsulante e a curcumina (SILVA-BUZANELLO et al., 2016).

A Figura 9 apresenta os espectros de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) dos compostos NP-branco, NP-curcumina, curcumina, MF.

Figura 9. Espectro de Infravermelho com Transformada de Fourier das NP-branco, NP-curcumina, Curcumina pura, Mistura-física.



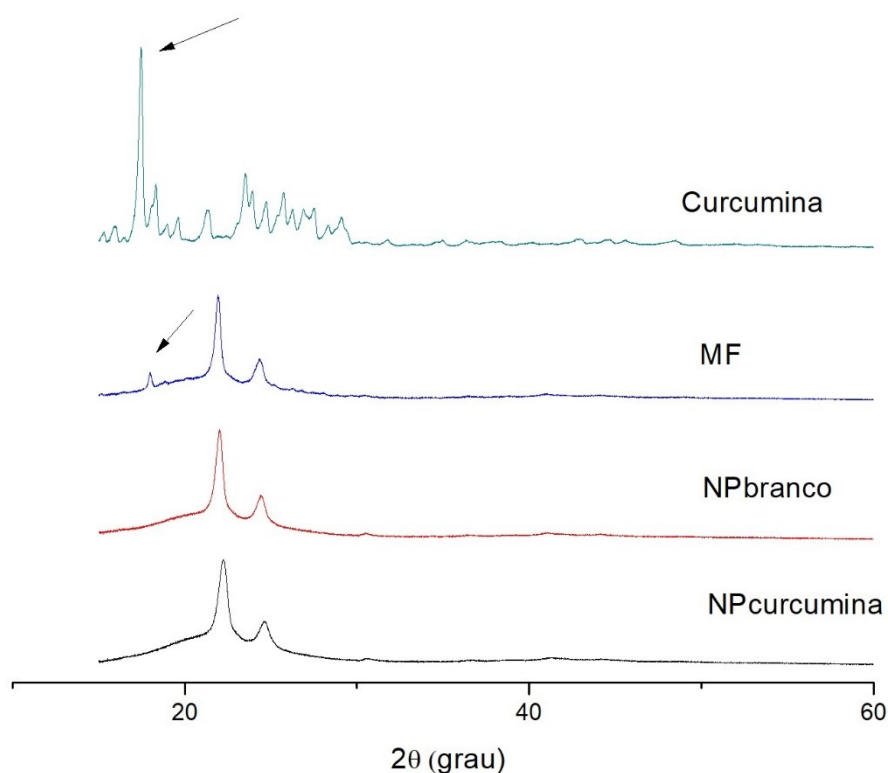
Fonte: Autoria própria (2020).

Pode-se notar no espectro da curcumina suas bandas características em 1629 cm^{-1} (C=O), 1603 cm^{-1} (CC aromático), 1509 cm^{-1} (C=C), 1428 cm^{-1} (CH alcenos), 1280 cm^{-1} (CO axial fenólico) (LEMES et al., 2017; MASSIMINO; FARIA; YOSHIOKA, 2017). Os espectros de FTIR mostraram bandas características em relação às vibrações do grupo livre de fenol OH para a curcumina (MASSIMINO; FARIA; YOSHIOKA, 2017; SÁ et al., 2019). A faixa de absorção de hidroxila é relativamente intensa no espectro da curcumina e foi atenuada na MF. Esta faixa apresentou-se ausente no espectro de FTIR das NP-curcumina, confirmando os resultados do DSC e sugerindo o aprisionamento da curcumina dentro da matriz de PCL.

O espectro de nanopartículas de curcumina apresentaram picos com menor intensidade quando comparados à mistura física, sugerindo que algum grau de interação entre a curcumina e os demais componentes ocorreu nas nanopartículas e também que a curcumina pode estar aprisionada dentro das nanopartículas (LEIMANN et al., 2015; LEMES et al., 2017). Para PCL, a banda característica de poliésteres relacionados ao alongamento C = O pode ser encontrada entorno de 1700 cm^{-1} (LEIMANN et al., 2015), nos espectros pode-se observar a presença do pico característico do PCL, excluindo o espectro da curcumina, o que é esperado.

A Figura 10 apresenta os difratogramas obtidos para NP-curcumina, NP-branco, MF e curcumina.

Figura 10. Resultados de Difração de Raios-X do PCL (NP-branco), curcumina, mistura física, Nanopartículas de curcumina (NP-curcumina).



Fonte: Autoria própria (2020).

O difratograma das partículas de PCL mostraram dois picos de difração características a $2\theta = 21,9^\circ$ e $24,3^\circ$, respectivamente, característicos da estrutura cristalina ortorrômbica do PCL (TAVARES et al., 2017), estes picos é consistente com estudos anteriores (NIYOM et al., 2019; TAVARES et al., 2017). Quando as nanopartículas com curcumina foram formadas, o pico de difração de PCL a $2\theta = 21,9^\circ$ mudou para $2\theta = 22,1^\circ$, sugerindo um aumento na distância entre as cadeias poliméricas neste plano cristalino. O padrão de difração da curcumina pura mostrou pico pontiagudo em $2\theta = 17,5^\circ$ (destacado na figura 10), corroborando com dados da literatura (BEHBAHANI et al., 2017). Este pico não esteve presente em difratogramas de NP-curcumina e no difratograma do PCL (NP-branco). Todavia, na mistura física foi possível observar este pico característico da curcumina em $17,9^\circ$ (destacado na Figura 10). Além

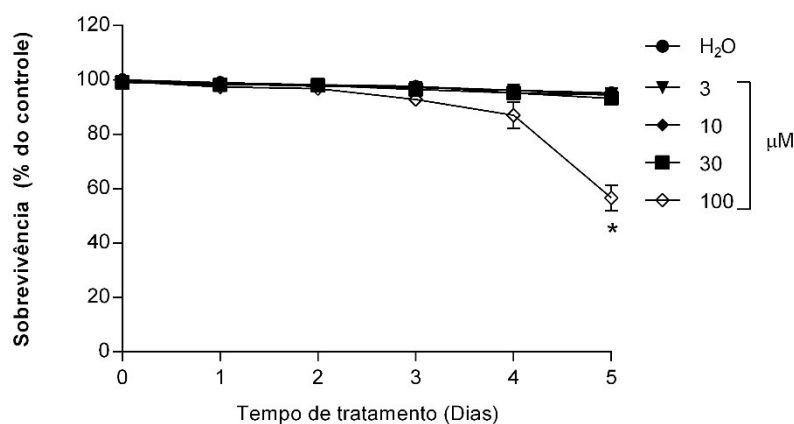
disso, olhando para os padrões de difração de NP-curcumina e NP-branco, pode-se perceber que a adição de curcumina na partícula não mudou a natureza do polímero, sugerindo ainda que a curcumina foi aprisionada na matriz polimérica, corroborando com resultados citados anteriormente neste trabalho.

5.2 ENSAIOS in vivo EM *D. melanogaster*

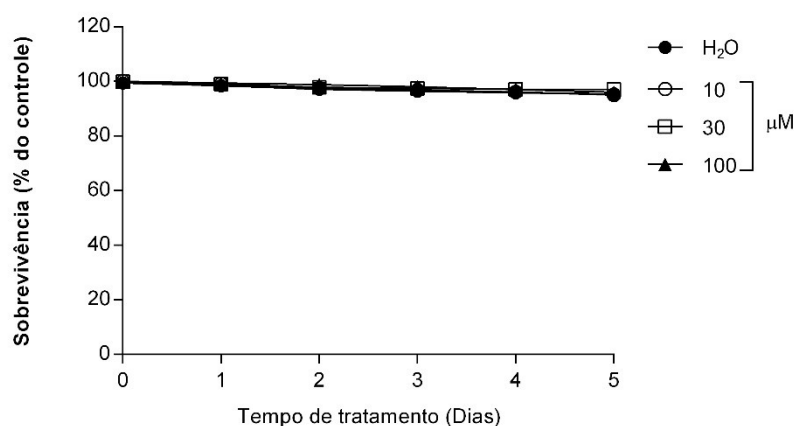
5.2.1 Taxa de Sobrevivência

Neste estudo, foi determinado o efeito da dieta suplementada com nanopartículas de curcumina e curcumina livre na taxa de sobrevivência de DM (Fig. 11A e 11B).

Figura 11. Efeito da dieta suplementada com nanopartículas de curcumina (A) e curcumina livre (B) na taxa de sobrevivência em *D. melanogaster*. Os dados são apresentados como a média \pm erro padrão. Cada ensaio foi realizado em cinco experiências independentes (* $p < 0,05$ em relação ao controle). O grupo controle recebeu dieta com suplemento padrão e água.



(A) Nanopartículas carregadas com curcumina.



(B) Curcumina.

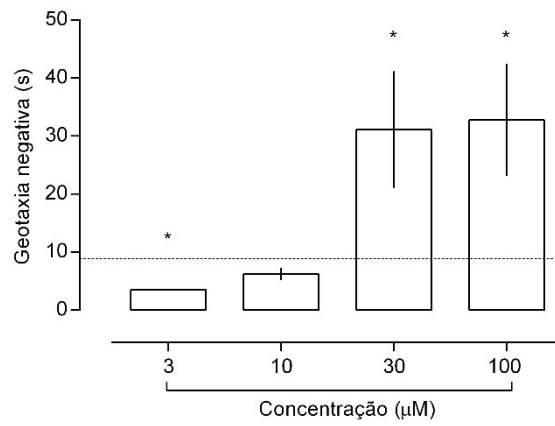
(C) Fonte: Autoria própria (2020).

Ao analisar os resultados *in vivo*, vale ressaltar que tanto a curcumina quanto as nanopartículas carregadas com curcumina dispersaram em meio aquoso e depois no suplemento alimentar das DM que por sua vez é altamente hidrofílico. As DM mantidas em meio contendo curcumina em todas as concentrações (Fig. 11 B) não apresentaram alterações significativas na taxa de sobrevivência quando comparadas ao controle. NP-curcumina (3, 10 e 30 μM) por 5 dias não apresentou mortalidade significativa. No entanto, a taxa de sobrevivência de moscas suplementadas com 100 μM de NP-curcumina (Fig. 11 A) mostrou uma diminuição significativa em comparação com o controle. A influência da curcumina *per se* na taxa de sobrevivência de DM foi demonstrada em outros estudos (ABOLAJI et al., 2020; SOH et al., 2013), mas a atividade da curcumina aprisionada em nanopartículas de PCL ainda é pouco entendida. No presente estudo, a suplementação de curcumina na dieta de DM sugere que o processo de encapsulação da curcumina não alterou sua bioatividade, embora tenha aumentado a solubilidade em água.

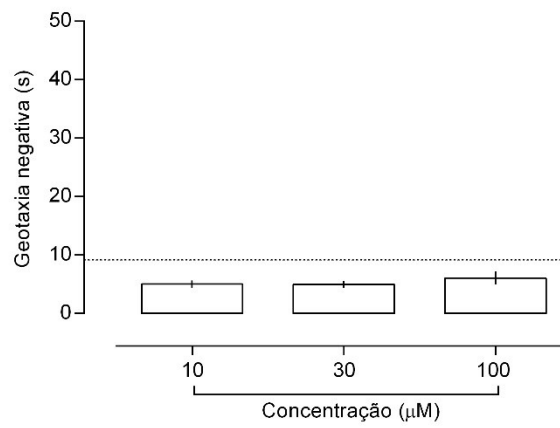
5.2.2 Desempenho locomotor

O teste de geotaxia negativa e base-topo foram usados para analisar a influência na capacidade locomotora em DM suplementadas com nanopartículas carregadas de curcumina e curcumina livre (Fig. 12 A, 12 B, 12 C, 12 D).

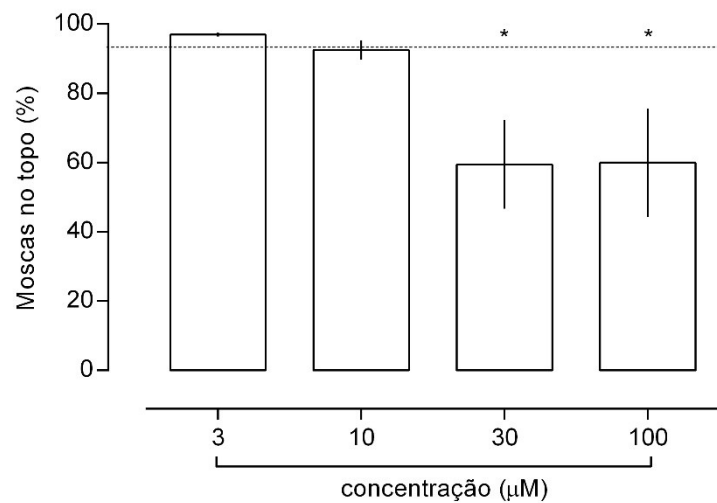
Figura 12. Efeito de nanopartículas carregadas com curcumina (NP-curcumina) e curcumina livre na função locomotora em DM. Taxa de escalada (expressa como o tempo gasto em segundos para escalar 8 cm) em moscas suplementadas com (a) Nanopartículas carregadas com curcumina e (b) Curcumina. Número de moscas no topo (expresso como porcentagem de escalada de 6 cm em 5 s) por ensaio de base topo em moscas suplementadas com (c) Nanopartículas carregadas com curcumina e (d) curcumina. A linha tracejada representa os valores do controle. Os dados são apresentados como a média \pm erro padrão. Cada ensaio foi realizado em cinco experiências independentes (* $p < 0,05$ em relação ao controle). Os grupos de controle receberam dieta com suplemento padrão e água.



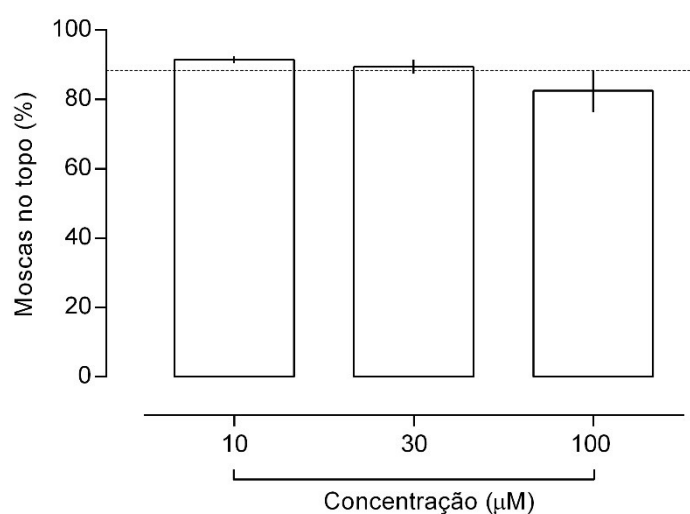
(A) Nanopartículas carregadas com curcumina.



(B) Curcumina.



(C) Nanopartículas carregadas com curcumina.



(D) Curcumina.

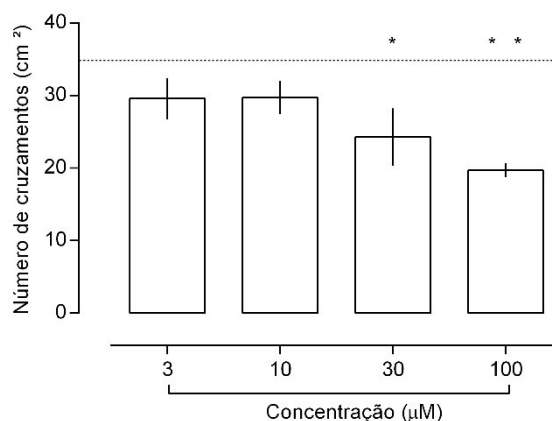
Fonte: Autoria própria (2020).

A escalada vertical é uma avaliação da capacidade do animal de realizar uma atividade exaustiva, assim, as moscas precisam trabalhar contra a gravidade para subir até o topo do frasco, fornecendo informações sobre seu nível de aptidão física (LEE et al., 2010). O desempenho na escalada foi avaliado pelo teste de geotaxia negativa e base-topo. Na geotaxia negativa o tempo médio gasto pelas moscas para chegar ao topo da coluna foi observado. As moscas suplementadas com NP-curcumina exibiram um déficit motor significativo dependente da dose. O desempenho locomotor diminuiu significativamente nas concentrações de 30 e 100 µM (* $p < 0,05$) em comparação com o grupo controle. Em 3 µM apresentou um aumento significativo (* $p < 0,05$ quando comparado ao controle) na velocidade das moscas em realizar a subida, apresentando uma diminuição do tempo médio gasto por estas, para atingir a altura desejada (Fig. 12 A). Para as moscas suplementadas com curcumina livre, não foi exibido resultados significativos em relação ao comprometimento do desempenho de escalada comparado a seu controle, para nenhuma das concentrações de curcumina utilizada (Fig. 12 B). Para o teste de base-topo, observou-se que quando as moscas foram tocadas no fundo do frasco, mais de 90% das moscas pertencentes ao grupo controle alcançaram o topo da coluna em 5s. No entanto, a suplementação com as NP-curcumina nas concentrações 30 e 100 µM exibiram um decaimento significativo na capacidade de subida das moscas pertencentes a estes grupos em comparação ao controle (Fig. 12 C; * $p < 0,05$). Em contrapartida, as moscas suplementadas com curcumina não exibiram

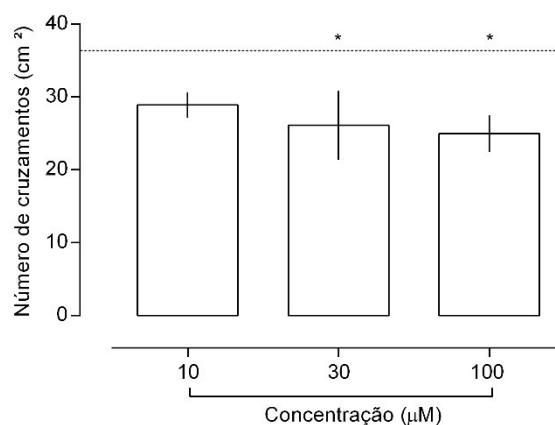
comprometimento locomotor significativo em relação a seu grupo controle (Fig. 12 D). Resultados semelhantes foram apresentados para ensaios em tratamento de DM com curcumina (0,2 e 1,0 mg/g) (AKINYEMI et al., 2018). A semelhança nos resultados também foram notadas com a utilização de uma dose 1mM de curcumina administradas a dieta das moscas (LIU et al., 2013). Evidências de que a curcumina é pouco absorvida e fortemente metabolizada em animais, sugere a necessidade de usar doses grandes (1 mM) para obter efeito neuroprotetor em moscas. Deste modo, o desenvolvimento de derivados da curcumina com maior biodisponibilidade pode levar à melhor utilidade terapêutica da curcumina (LIU et al., 2013).

O teste de campo aberto foi realizado para analisar a influência na função exploratória de nanopartículas carregadas de curcumina e curcumina em DM (Fig. 13 A, 13 B).

Figura 13. Efeito de nanopartículas carregadas com curcumina (NP-curcumina) e curcumina livre na função comportamental em DM. Valores de cruzamento (expressos como número de cruzamentos de uma área de 1 cm²) em moscas suplementadas com (A) NP-curcumina e (B) Curcumina. A linha tracejada representa os valores do controle. Os dados são apresentados como a média ± erro padrão. Cada ensaio foi realizado em cinco experiências independentes (*p<0,05; **p<0,01 em relação ao controle). Os grupos de controle receberam dieta com suplemento padrão e água.



(A) Nanopartículas carregadas com curcumina.



(B) Curcumina.

Fonte: Autoria própria (2020).

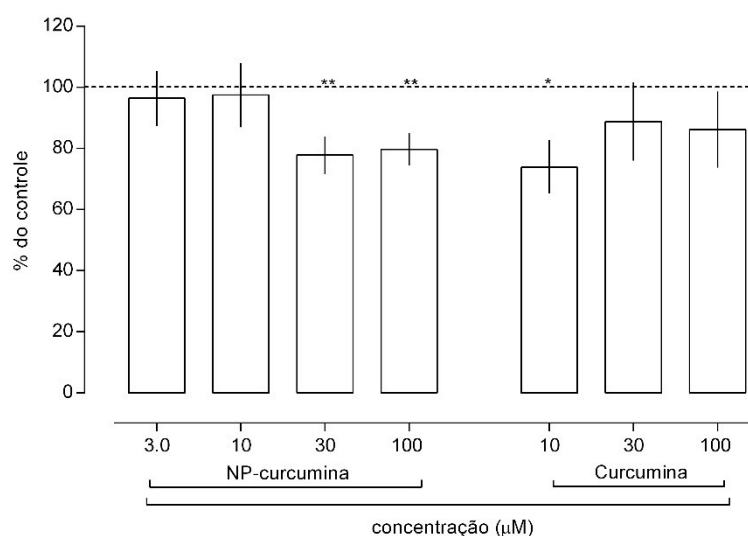
O estudo pelo teste de campo aberto mostra que o grupo exposto à NP-Curcumina e curcumina em concentrações de 30 e 100µM apresentaram menor atividade exploratória quando comparado ao grupo controle (Fig. 13 A e Fig. 13 B; $p < 0.05$) sugerindo que a matriz polimérica não apresentou influência no comportamento exploratório das moscas em relação a curcumina livre. Estudos relacionados com a indução de danos comportamentais e bioquímicos em modelo de DM por exposição a compostos nocivos e a investigação do efeito curativo/reversivo por suplementação com fotoquímicos estão bastante evidentes, demonstrando resultados satisfatórios e interessantes para a administração de curcumina com a finalidade de reduzir o estresse oxidativo causada por substâncias tóxicas presente no ambiente (PARK et al., 2012).

5.3 ENSAIOS *ex vivo* EM *D. melanogaster*

5.3.1 Determinação da atividade das colinesterases AChE e BChE

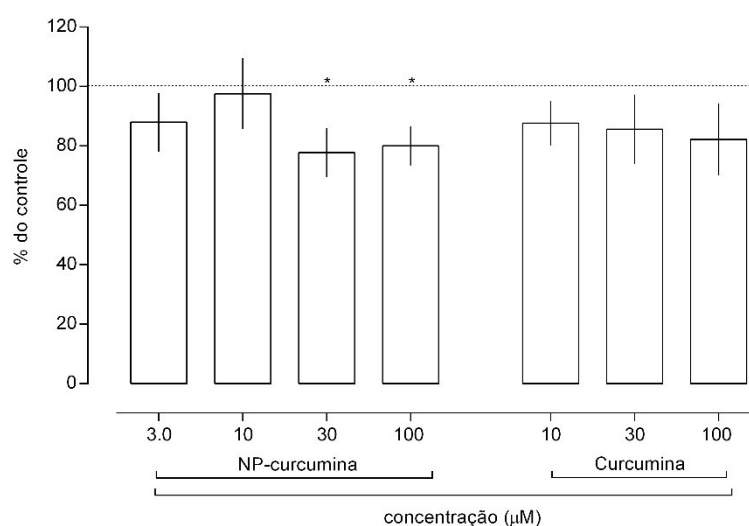
Figura 14. Efeito das nanopartículas contendo curcumina e curcumina livre na atividade da enzima AChE *ex vivo* no tecido de *Drosophila melanogaster*. A linha tracejada representa o valor do grupo controle. Valores expressos em média \pm erro padrão ($n = 5$ por grupo). Significância determinada pela

análise de variância unidirecional (ANOVA) seguida do teste de Tukey. (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ em relação ao controle).



Fonte: Autoria própria (2020).

Figura 15. Efeito das nanopartículas contendo curcumina e curcumina livre na atividade da enzima BChE *ex vivo* no tecido de *Drosophila melanogaster*. A linha tracejada representa o valor do grupo controle. Valores expressos em média \pm erro padrão ($n = 5$ por grupo). Significância determinada pela análise de variância unidirecional (ANOVA) seguida do teste de Tukey. * $p < 0,05$ em comparação ao controle.



Fonte: Autoria própria (2020).

A ACh é um neurotransmissor de caráter excitatório elementar no sistema nervoso central associado ao parâmetro comportamental de grande interesse científico

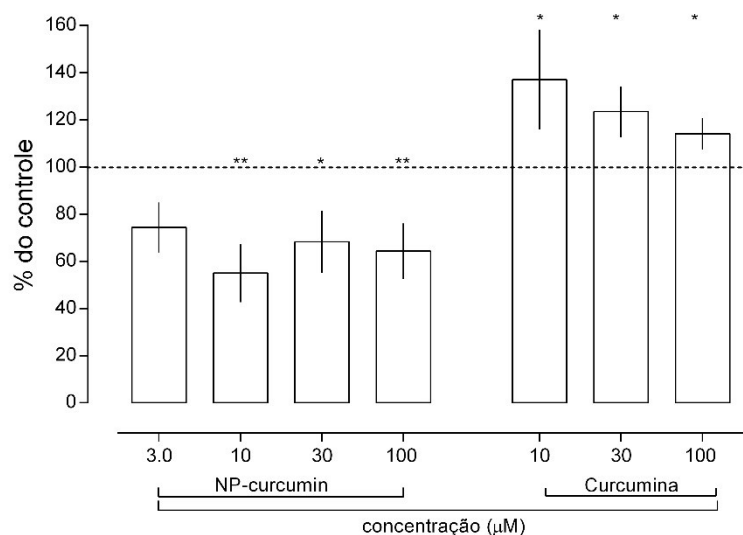
(ARAUJO et al., 2015). A ACh tem sua ação fisiológica interrompida através de hidrólise catalítica nas sinapses colinérgicas do sistema nervoso pelas colinesterases AChE que está associada principalmente a neurônios e a BChE que é excretada pelas células da glia no cérebro. A maioria da atividade da colinesterase no cérebro humano saudável é responsabilidade da AChE, devido à sua maior disponibilidade (4:1) em comparação ao BChE (OMAR et al., 2017). Os efeitos da curcumina livre e encapsulada em marcadores colinérgicos avaliados em DM são mostrados na Figura 14 para a AChE e Figura 15 para a BChE. A atividade da AChE foi inibida significativamente a 30 e 100 μM para as NP-curcumina ($p < 0.01$ quando comparado ao grupo controle) e uma inibição significativa a 10 μM para a curcumina (Fig. 14; $p < 0.05$ quando comparado ao grupo controle). A influência da curcumina pura sobre a atividade da AChE foi demonstrada por (ABOLAJI et al., 2020; AKINYEMI et al., 2018) que também relataram uma diminuição da atividade da AChE em relação ao controle. Como um aumento ou uma diminuição da atividade da AChE pode comprometer a atividade locomotora e outros comportamentos (OYETAYO et al., 2020), a diminuição observada na atividade da AChE em moscas suplementadas com NP-curcumina pode ser a razão do comprometimento locomotor observado nas moscas deste estudo.

A atividade da BChE foi inibida significativamente a 30 e 100 μM para as NP-curcumina ($p < 0,05$, quando comparado ao grupo controle). Para o mesmo ensaio com curcumina não houve diferença significativa da atividade da BChE em relação ao controle. Estudos sugerem que substâncias capazes de aumentar os níveis em concentração e duração de ação da ACh através da inibição da AChE e BChE fornecem benefícios terapêuticos, bem como neuroproteção (LOIZZO et al., 2008; OMAR et al., 2017). Os resultados exposto neste estudo demonstrando a inibição das colinesterases a partir de 30 μM também foi observado pelo nosso grupo de pesquisa em experimentos *in vitro* com *Drosophila melanogaster* com nanopartículas contendo curcumina mas com diferentes encapsulantes (SÁ et al., 2019). A influência de nanopartículas de curcumina nas enzimas AChE e BChE ainda é pouco conhecida, no entanto, estudos com letalidade induzida por exposição a compostos nocivos às células em DM foram avaliados, utilizando curcumina pura como constituinte de efeito neuroprotetor. Estes estudos mostraram redução da atividade das enzimas colinérgicas bem como a capacidade de compensar a neurotoxicidade induzida (PARK et al., 2012; PRASAD; MURALIDHARA, 2014).

5.3.1 Determinação da atividade de enzimas antioxidantes CAT e Grupos Tióis

O efeito da dieta suplementada com nanopartículas carregadas com curcumina e curcumina livre no perfil antioxidante foi determinado usando a atividade da enzima catalase (CAT) e grupos tiol como marcadores antioxidantes em DM.

Figura 16. Efeito das nanopartículas contendo curcumina e curcumina livre na atividade da enzima CAT *ex vivo* no tecido de *Drosophila melanogaster*. A linha tracejada representa o valor do grupo controle. Valores expressos em média \pm erro padrão (n = 5 por grupo). Significância determinada pela análise de variância unidirecional (ANOVA) seguida do teste de Tukey. (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ em relação ao controle).

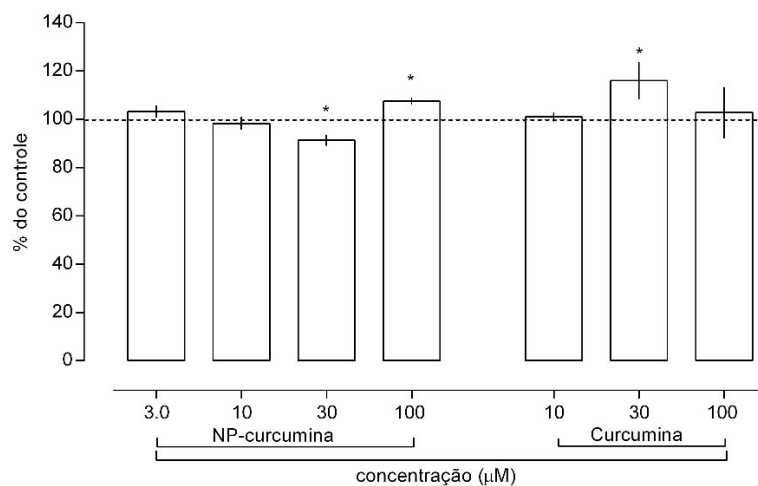


Fonte: Autoria própria (2020).

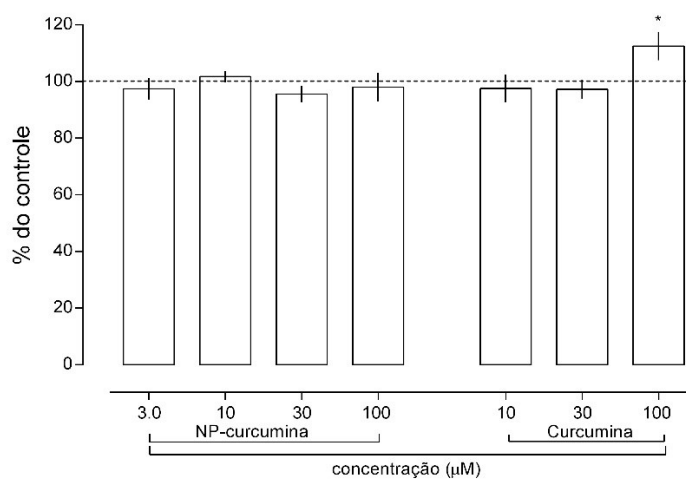
Na Figura 16, pode-se observar uma diminuição da atividade da CAT para as NP-Curcumin a 10 μM ($p < 0,01$) de 46%, 30 μM ($p < 0,05$) de 32% e 100 μM ($p < 0,01$) de 36% comparados ao grupo controle. Enquanto que para os ensaios de suplementação de curcumina livre foram observados o aumento significativo ($p < 0,05$ quando comparado ao grupo controle) da atividade da CAT para todos os grupos tratados. Resultados semelhantes foram obtidos por (AKINYEMI et al., 2018) ao suplementar DM com curcumina (1,0mg/g) e avaliar o consumo de H_2O_2 a 240nm em espectrofotômetro. Além disso, moscas suplementadas (0,2 mg/g) por 7 dias com curcumina demonstraram aumento da atividade da CAT em todos os tratamentos (CHEN et al., 2018).

Figura 17. Efeito das nanopartículas contendo curcumina e curcumina livre nos níveis de Tióis totais (A) e Tióis não proteico (B) *ex vivo* no tecido de *Drosophila melanogaster*. A linha tracejada representa o

valor do grupo controle. Valores expressos em média \pm erro padrão (n = 5 por grupo). Significância determinada pela análise de variância unidirecional (ANOVA) seguida do teste de Tukey. (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ em relação ao controle).



(A) Tióis Totais.



(B) Tióis não proteico.

Fonte: Autoria própria (2020).

Os níveis de tióis totais (Fig. 17 A), apresentaram aumento significativo ($p < 0,05$) em 100 e 30 μM para NP-curcumina e curcumina livre, respectivamente, comparado a seus respectivos controles. Os grupos tióis não proteicos não apresentaram alterações para nenhum dos grupos testados com a administração de NP-curcumin (Fig. 17 B).

Todavia, para ensaios com curcumina livre, foi observado um aumento significativo ($p < 0,05$ quando comparado ao grupo controle) a $100 \mu\text{M}$. Demonstrou-se anteriormente que concentrações de curcumina à $0,5$ e $1 \mu\text{M}$ administradas em *Drosophila melanogaster* não afetou significativamente os níveis de tióis totais e a atividade da catalase (ABOLAJI et al., 2020). Baseado nos resultados encontrados, acreditamos que os níveis de tiol total e de H_2O_2 , bem como a atividade da CAT podem estar relacionados com a dose de curcumina administrada nos tratamentos.

6 CONCLUSÃO

As nanopartículas de policaprolactona carregadas com curcumina foram eficientemente produzidas pelo método de miniemulsão/evaporação do solvente. Os resultados da caracterização demonstraram que partículas nanométricas foram formadas e também sugeriram fortemente que a curcumina foi aprisionada dentro da matriz polimérica, formando uma mistura homogênea de policaprolactona e curcumina. A suplementação de nanopartículas carregadas com curcumina na dieta de *Drosophila melanogaster* não apresentaram letalidade nas doses testadas e mantiveram as características da curcumina, sugerindo a baixa toxicidade das nanopartículas. Os resultados encontrados nos testes *in vivo* quanto nos testes *ex vivo* corroboram que as alterações comportamentais encontradas estão em conformidade com as atividades enzimáticas (AChE e BChE), bem como com as análises antioxidantes. Acreditamos que mais estudos usando *Drosophila* e outros modelos *in vivo* podem ser necessários para investigar a toxicidade das NP-curcumina bem como os mecanismos envolvidos. Todavia, este estudo sugere que o processo de encapsulação da curcumina não alterou sua bioatividade, embora tenha aumentado a solubilidade em água. Também, indica que as NP-curcumina tem potencial para ser usado na formulação da dieta de *Drosophila* e em formulações alimentícias, devido a sua melhor solubilidade em água e baixa toxicidade. Portanto, esse trabalho cumpriu com o objeto proposto, uma vez que foi eficiente na preparação das nanopartículas de curcumina, aumentou a sua solubilidade em água, não apresentou toxicidade e apresentou concordância em testes *in vivo* e *ex vivo*.

7 PERSPECTIVAS FUTURAS

Serão realizadas análises de toxicidade em outros modelos de teste para investigar a nanotoxicidade destas partículas. Estes experimentos visam estudar a atividade antiinflamatória e citotóxica das nanopartículas contendo curcumina na atividade de células tumorais e não tumorais. Além disso, será investigado a potencial toxicidade e a capacidade das nanopartículas contendo curcumina em induzir danos ao DNA empregando teste de genotoxicidade e citotoxicidade de *Allium cepa* e *Caenorhabditis elegans*.

REFERÊNCIAS

- ABOLAJI, A. O. et al. Curcumin attenuates copper-induced oxidative stress and neurotoxicity in *Drosophila melanogaster*. **Toxicology Reports**, v. 7, n. January, p. 261–268, 2020.
- ADEDARA, I. A. et al. Influence of diphenyl diselenide on chlorpyrifos-induced toxicity in *Drosophila melanogaster*. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 32, p. 52–59, 2015.
- AEBI, H. [13] Catalase in Vitro. **Methods in Enzymology**, v. 105, n. C, p. 121–126, 1984.
- 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. 457–468, 2010.
- AKINYEMI, A. J. et al. Curcumin-supplemented diets improve antioxidant enzymes and alter acetylcholinesterase genes expression level in *Drosophila melanogaster* model. **Metabolic Brain Disease**, v. 33, n. 2, p. 369–375, 2018.
- ARAIZA-CALAHORRA, A.; AKHTAR, M.; SARKAR, A. Recent advances in emulsion-based delivery approaches for curcumin: From encapsulation to bioaccessibility. **Trends in Food Science & Technology**, v. 71, p. 155–169, jan. 2018.
- ARAÚJO, C. R. M.; SANTOS, V. L. A.; GONSALVES, A. A. Acetilcolinesterase - AChE: Uma Enzima de Interesse Farmacológico. **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 γ -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.
- ARYAL, B.; LEE, Y. Disease model organism for Parkinson disease: *Drosophila melanogaster*. **BMB Reports**, v. 52, n. 4, p. 250–258, 2019.
- BARBOSA, K. B. F. et al. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutrição**, v. 23, n. 4, p. 629–643, ago. 2010.
- BAZANA, M. T.; CODEVILLA, C. F.; DE MENEZES, C. R. Nanoencapsulation of bioactive compounds: challenges and perspectives. **Current Opinion in Food Science**, v. 26, p. 47–56, abr. 2019.
- BEGUM, S. et al. In-vitro evaluation and in-silico studies applied on newly synthesized amide derivatives of N-phthaloylglycine as Butyrylcholinesterase (BChE) inhibitors.

Computational Biology and Chemistry, v. 74, p. 212–217, jun. 2018.

BEHBAHANI, E. S. et al. Optimization and characterization of ultrasound assisted preparation of curcumin-loaded solid lipid nanoparticles: Application of central composite design, thermal analysis and X-ray diffraction techniques. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 38, p. 271–280, set. 2017.

BEZERRA, E. B. et al. Comportamento reológico do Bio-PE e do PCL na presença do PEGAA e PEGMA. **Matéria (Rio de Janeiro)**, v. 22, n. 1, 2017.

BOTHAM, P. . Acute systemic toxicity—prospects for tiered testing strategies. **Toxicology in Vitro**, v. 18, n. 2, p. 227–230, abr. 2004.

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.

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

CAKA, M. et al. Controlled release of curcumin from poly(HEMA-MAPA) membrane. **Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology**, v. 45, n. 3, p. 426–431, 2017.
CAMBRUSSI, A. N. C. O. et al. The role of nanotechnology in reducing oxidative stress: a review Anallyne. **Informative Geum Bulletin**, v. 9, n. 2, p. 1–11, 2018.

CAMPOS, A. DE; MARCONATO, J. C.; FRANCHETTI, S. M. M. Biodegradação de filmes de PP/PCL em solo e solo com chorume. **Polímeros**, v. 20, n. 4, p. 295–300, nov. 2010.

CAMPOS, S. C. et al. Toxicidade de espécies vegetais. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 18, n. 1 suppl 1, p. 373–382, 2016.

CARLOS, R. M. et al. Artigo Avaliação da bioatividade dos extratos de cúrcuma (*Curcuma longa* L ., Zingiberaceae) em *Artemia salina* e *Biomphalaria glabrata*. v. 19, n. January, p. 919–923, 2009.

CHAHARBAND, F. et al. Formulation and in vitro evaluation of curcumin-lactoferrin conjugated nanostructures for cancerous cells. **Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology**, v. 46, n. 3, p. 626–636, 2018.

CHEN, Y. et al. Curcumin supplementation increases survival and lifespan in *Drosophila* under heat stress conditions. **BioFactors**, v. 44, n. 6, p. 577–587, 2018.
CHUAN, L. et al. HHS Public Access. v. 13, n. 9, p. 641–652, 2017.

CODEVILLA, C. F. et al. Incorporação da curcumina em sistemas nanoestruturados: Revisão. **Ciência e Natura**, v. 37, n. 0, p. 152, 2015.

CONTESTABILE, A. The history of the cholinergic hypothesis. **Behavioural Brain Research**, v. 221, n. 2, p. 334–340, ago. 2011.

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

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

DAVEREY, A.; AGRAWAL, S. K. Curcumin alleviates oxidative stress and mitochondrial dysfunction in astrocytes. **Neuroscience**, v. 333, p. 92–103, out. 2016.

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.

DEMIDCHIK, V. Mechanisms of oxidative stress in plants: From classical chemistry to cell biology. **Environmental and Experimental Botany**, v. 109, p. 212–228, jan. 2015.

DHOUIB, I. B. et al. Neuroprotective effects of curcumin against acetamiprid-induced neurotoxicity and oxidative stress in the developing male rat cerebellum: biochemical, histological, and behavioral changes. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 24, n. 35, p. 27515–27524, 2017.

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

DUMAS, J. A.; NEWHOUSE, P. A. The cholinergic hypothesis of cognitive aging revisited again: Cholinergic functional compensation. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 99, n. 2, p. 254–261, ago. 2011.

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

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 43, n. 1, p. 61–68, mar. 1997.

FERREIRA, C. T. G. Nanopartículas Poliméricas Para Inclusão De Compostos De Origem Natural. 2013.

FUJII, T. et al. Physiological functions of the cholinergic system in immune cells. **Journal of Pharmacological Sciences**, v. 134, n. 1, p. 1–21, maio 2017.

GRIGORAS, A. G. Catalase immobilization—A review. **Biochemical Engineering Journal**, v. 117, p. 1–20, jan. 2017.

GUNSOLUS, I. L.; HAYNES, C. L. Analytical Aspects of Nanotoxicology. **Analytical Chemistry**, v. 88, n. 1, p. 451–479, 2016.

HAMM, J. et al. Alternative approaches for identifying acute systemic toxicity: Moving from research to regulatory testing. **Toxicology in Vitro**, v. 41, p. 245–259, 2017.

HAMPEL, H. et al. The cholinergic system in the pathophysiology and treatment of Alzheimer's disease. **Brain**, v. 141, n. 7, p. 1917–1933, jul. 2018.

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

HOLMES, A. M.; CRETON, S.; CHAPMAN, K. Working in partnership to advance the 3Rs in toxicity testing. **Toxicology**, v. 267, n. 1–3, p. 14–19, jan. 2010.

HUMINIECKI, L.; HORBAŃCZUK, J.; ATANASOV, A. G. The functional genomic studies of curcumin. **Seminars in Cancer Biology**, v. 46, p. 107–118, out. 2017.

HUSSAIN, Z. et al. Exploring recent developments to improve antioxidant, anti-inflammatory and antimicrobial efficacy of curcumin: A review of new trends and future perspectives. **Materials Science and Engineering C**, v. 77, p. 1316–1326, 2017a.

HUSSAIN, Z. et al. Nanoencapsulation, an efficient and promising approach to maximize wound healing efficacy of curcumin: A review of new trends and state-of-the-art. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 150, p. 223–241, 2017b.

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, 2018.

JAFARI, S. M.; MCCLEMENTS, D. J. Nanotechnology Approaches for Increasing Nutrient Bioavailability. **Advances in Food and Nutrition Research**, v. 81, p. 1–30, jan. 2017.

JIANG, Y.; GAO, H.; TURDU, G. Traditional Chinese medicinal herbs as potential AChE inhibitors for anti-Alzheimer's disease: A review. **Bioorganic Chemistry**, v. 75, p. 50–61, dez. 2017.

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

KANT, V. et al. Antioxidant and anti-inflammatory potential of curcumin accelerated the cutaneous wound healing in streptozotocin-induced diabetic rats. **International Immunopharmacology**, v. 20, n. 2, p. 322–330, 2014.

KATSOGIANNIS, K. A. G.; VLADISAVLJEVIĆ, G. T.; GEORGIADOU, S. Porous electrospun polycaprolactone (PCL) fibres by phase separation. **European Polymer Journal**, v. 69, p. 284–295, ago. 2015.

KAUSHAL, J. et al. Catalase enzyme: Application in bioremediation and food industry. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 16, p. 192–199, out. 2018.

KHANNA, P. et al. Nanotoxicity: An interplay of oxidative stress, inflammation and cell death. **Nanomaterials**, v. 5, n. 3, p. 1163–1180, 2015.

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.

KOCAADAM, B.; ŞANLIER, N. Curcumin, an active component of turmeric (*Curcuma longa*), and its effects on health. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 57, n. 13, p. 2889–2895, 2017.

KUMARI, A.; YADAV, S. K. Nanotechnology in Agri-Food Sector Nanotechnology in Agri-Food Sector. v. 8398, 2014.

KUMARI, A.; YADAV, S. K.; YADAV, S. C. Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 75, n. 1, p. 1–18, jan. 2010.

LEE, K. S. et al. Curcumin extends life span, improves health span, and modulates the expression of age-associated aging genes in *drosophila melanogaster*. **Rejuvenation Research**, v. 13, n. 5, p. 561–570, 2010.

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

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.

LI, X. et al. Generation of a whole-brain atlas for the cholinergic system and mesoscopic projectome analysis of basal forebrain cholinergic neurons. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 115, n. 2, p. 415–420, jan. 2018.

LIANG, H.; FRIEDMAN, J. M.; NACHARAJU, P. Fabrication of biodegradable PEG–PLA nanospheres for solubility, stabilization, and delivery of curcumin. **Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology**, v. 45, n. 2, p. 297–304, 2017.

LIAQUAT, L. et al. Naringenin-induced enhanced antioxidant defence system meliorates cholinergic neurotransmission and consolidates memory in male rats. **Life Sciences**, v. 194, p. 213–223, fev. 2018.

LIU, Z. et al. Curcumin protects against rotenone-induced neurotoxicity in cell and *drosophila* models of Parkinson's disease. **Advances in Parkinson's Disease**, v. 02, n. 01, p. 18–27, 2013.

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

MARTELLI, F.; NUNES, F. M. F. Radicais livres: em busca do equilíbrio. **Ciência e Cultura**, v. 66, n. 3, p. 54–57, set. 2014.

MASSIMINO, L. C.; FARIA, H. A. M.; YOSHIOKA, S. A. Curcumin bioactive nanosizing:

Increase of bioavailability. **Industrial Crops and Products**, v. 109, p. 493–497, dez. 2017.

MATÉS, >J.M. Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. **Toxicology**, v. 153, n. 1–3, p. 83–104, nov. 2000.

MATÉS, J. M.; PÉREZ-GÓMEZ, C.; DE CASTRO, I. N. Antioxidant enzymes and human diseases. **Clinical Biochemistry**, v. 32, n. 8, p. 595–603, nov. 1999.

MATHEW, D.; HSU, W.-L. Antiviral potential of curcumin. **Journal of Functional Foods**, v. 40, p. 692–699, jan. 2018.

MIRAKABAD, F. S. T. et al. A Comparison between the cytotoxic effects of pure curcumin and curcumin-loaded PLGA-PEG nanoparticles on the MCF-7 human breast cancer cell line. **Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology**, v. 44, n. 1, p. 423–430, 2016.

MIRONCZUK-CHODAKOWSKA, I.; WITKOWSKA, A. M.; ZUJKO, M. E. Endogenous non-enzymatic antioxidants in the human body. **Advances in Medical Sciences**, v. 63, n. 1, p. 68–78, 2018.

MOHAMED, S. A. et al. Chemical modification of curcumin: Solubility and antioxidant capacity. **International Journal of Food Properties**, v. 20, n. 3, p. 718–724, 2017.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1–2, p. 55–63, 1983.

MUSYANOVYCH, A. et al. Preparation of biodegradable polymer nanoparticles by miniemulsion technique and their cell interactions. **Macromolecular Bioscience**, v. 8, n. 2, p. 127–139, 2008.

NIYOM, Y. et al. Synergy between polymer crystallinity and nanoparticles size for payloads release. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 550, p. 139–146, ago. 2019.

OMAR, S. H. et al. The protective role of plant biophenols in mechanisms of Alzheimer's disease. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 47, p. 1–20, 2017.

OYETAYO, B. O. et al. Ameliorative role of diets fortified with Curcumin in a *Drosophila melanogaster* model of aluminum chloride-induced neurotoxicity. **Journal of Functional Foods**, v. 71, n. May, p. 104035, 2020.

PANDEY, U. B.; NICHOLS, C. D. Human Disease Models in. **Pharmacological Reviews**, v. 63, n. 2, p. 411–436, 2011.

PARK, J. H. et al. Neuroprotective properties of phytochemicals against paraquat-induced oxidative stress and neurotoxicity in *Drosophila melanogaster*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 104, n. 2, p. 118–125, 2012.

PATHAKOTI, K.; MANUBOLU, M.; HWANG, H. M. Nanostructures: Current uses and future applications in food science. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 25, n. 2, p. 245–253, 2017.

PEPEU, G.; GRAZIA GIOVANNINI, M. The fate of the brain cholinergic neurons in neurodegenerative diseases. **Brain Research**, v. 1670, p. 173–184, set. 2017.

PICH, A. et al. Preparation of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) (PHBV) particles in O/W emulsion. **Polymer**, v. 47, n. 6, p. 1912–1920, 2006.

PISOSCHI, A. M.; POP, A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 97, p. 55–74, jun. 2015.

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, 2014.

RAFIEE, Z. et al. Application of different nanocarriers for encapsulation of curcumin. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 0, n. 0, p. 1–30, 2018.

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

SABAT, D. et al. Investigation of titania nanoparticles on behaviour and mechanosensory organ of *Drosophila melanogaster*. **Physiology & Behavior**, v. 167, p. 76–85, dez. 2016.

SAMARGHANDIAN, S. et al. Anti-oxidative effects of curcumin on immobilization-induced oxidative stress in rat brain, liver and kidney. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 87, p. 223–229, mar. 2017.

SARTORETTO, S. C. et al. SHEEP AS AN EXPERIMENTAL MODEL FOR BIOMATERIAL IMPLANT EVALUATION. **Acta Ortopédica Brasileira**, v. 24, n. 5, p. 262–266, out. 2016.

SCHLIEBS, R.; ARENDT, T. The cholinergic system in aging and neuronal degeneration. **Behavioural Brain Research**, v. 221, n. 2, p. 555–563, ago. 2011.

SHI, L. Y. et al. Protective effects of curcumin on acrolein-induced neurotoxicity in HT22 mouse hippocampal cells. **Pharmacological Reports**, v. 70, n. 5, p. 1040–1046, 2018.

SHIN, S.; SONG, I.; UM, S. Role of Physicochemical Properties in Nanoparticle Toxicity. **Nanomaterials**, v. 5, n. 3, p. 1351–1365, 2015.

SHISHIR, M. R. I. et al. Advances in micro and nano-encapsulation of bioactive

compounds using biopolymer and lipid-based transporters. **Trends in Food Science & Technology**, v. 78, p. 34–60, ago. 2018.

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.

SITI, H. N.; KAMISAH, Y.; KAMSI AH, J. The role of oxidative stress, antioxidants and vascular inflammation in cardiovascular disease (a review). **Vascular Pharmacology**, v. 71, p. 40–56, ago. 2015.

SOH, J. W. et al. Curcumin is an early-acting stage-specific inducer of extended functional longevity in *Drosophila*. **Experimental Gerontology**, v. 48, n. 2, p. 229–239, 2013.

STRICKLAND, J. et al. Status of acute systemic toxicity testing requirements and data uses by U.S. regulatory agencies. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 94, p. 183–196, abr. 2018.

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

TAVARES, M. R. et al. Surface-coated polycaprolactone nanoparticles with pharmaceutical application: Structural and molecular mobility evaluation by TD-NMR. **Polymer Testing**, v. 60, p. 39–48, jul. 2017.

TRIVEDI, S. et al. 5-Desmethylnobiletin augments synaptic ACh levels and nicotinic ACh receptor activity: A potential candidate for alleviation of cholinergic dysfunction. **Neuroscience Letters**, v. 657, p. 84–90, set. 2017.

WANG, Y. et al. Superoxide dismutases: Dual roles in controlling ROS damage and regulating ROS signaling. **The Journal of Cell Biology**, v. 217, n. 6, p. 1915–1928, jun. 2018.

WIGGERS, H. J. et al. Curcumin, a Multitarget Phytochemical: Challenges and Perspectives. **Studies in Natural Products Chemistry**, v. 53, p. 243–276, jan. 2017.

WOODRUFF, M. A.; HUTMACHER, D. W. The return of a forgotten polymer—Polycaprolactone in the 21st century. **Progress in Polymer Science**, v. 35, n. 10, p. 1217–1256, out. 2010.

YANG, H. Y.; LEE, T. H. Antioxidant enzymes as redox-based biomarkers: A brief review. **BMB Reports**, v. 48, n. 4, p. 200–208, 2015.

YARIBEYGI, H.; ATKIN, S. L.; SAHEBKAR, A. A review of the molecular mechanisms of hyperglycemia-induced free radical generation leading to oxidative stress. **Journal of Cellular Physiology**, v. 234, n. 2, p. 1300–1312, 2019.

ZAFAR, N. et al. Elaboration of sponge-like biodegradable cationic particles via double-

emulsion solvent evaporation. **Journal of Dispersion Science and Technology**, v. 38, n. 4, p. 577–583, 2017.