



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
BIOTECNOLOGIA**

**Regildo Max Gomes Martins**

**Prospecção das propriedades farmacobotânicas do óleo essencial in natura e nanoencapsulado de *Siparuna guianensis* Aubl. em modelo experimental para Doença de Alzheimer.**

**Manaus  
2022**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
BIOTECNOLOGIA**

**Regildo Max Gomes Martins**

**Prospecção das propriedades farmacobotânicas do óleo essencial in natura e nanoencapsulado de *Siparuna guianensis* Aubl. em modelo experimental para Doença de Alzheimer.**

Tese apresentada ao Programa Multi-Institucional de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

**Orientador:** Dr. Francisco Humberto Xavier Junior  
**Coorientador:** Dra. Rosemary Aparecida Roque  
**Coorientador:** Dr. Antonio Alves de Melo Filho

**Manaus  
2022**

## Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

M386p Martins, Regildo Max Gomes  
Prospecção das propriedades farmacobotânicas do óleo essencial in natura e nanoencapsulado de Siparuna guianensis Aubl. em modelo experimental para doença de Alzheimer : estudo da atividade protetora do óleo essencial de Siparuna guianensis Aubl. / Regildo Max Gomes Martins . 2022  
162 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: Francisco Humberto Xavier Júnior  
Orientador: Wanderli Pedro Tadei  
Coorientadora: Rosemary Aparecida Roque  
Coorientador: Antonio Alves de Melo Filho  
Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Amazonas.

1. Siparuna guianensis Aubl.. 2. Nanotecnologia. 3. Shyobunona. 4. Acetilcolinesterase. 5. Doença de Alzheimer. I. Xavier Júnior, Francisco Humberto. II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

## **Termo de Aprovação**

**Tese defendida e aprovada como requisito para a obtenção do Título de Doutor em Biotecnologia em 27 de junho de 2022 pela banca examinadora:**

---

Prof. Dr. Francisco Humberto Xavier Júnior  
Orientador/Presidente

---

Profa. Dr. Everton do Nascimento Alencar  
Membro da Banca

---

Prof. Dra. Priscila Gubert  
Membro da Banca

---

Prof. Dr. Eunice da Silva Medeiros do Vale  
Membro da Banca

---

Prof. Dr. Valdir Florêncio da Veiga Jr  
Membro da Banca

**Manaus  
2022**

Dedico este trabalho aos inestimáveis professores Dr. Wanderli Pedro Tadei e Dr. Caio Rodrigo de Assis que contribuíram significativamente para a realização deste trabalho, paz e vida eterna.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus que tem sido e sempre será meu maior pilar, minha fonte de força e meu companheiro de estrada.

Aos meus pais, Sr. Jesus Martins e Maria Laudicéia pelo apoio nesta trajetória.

Ao querido Prof. Dr. Wanderli Pedro Tadei por acreditar neste trabalho e proporcionar o seu desenvolvimento sem medir esforços, fazendo-o com muito esmero e o carinho de um pai, levarei sua alegria e seu entusiasmo em minha memória! Vamos em frente!

Grato por conhecer um grande pesquisador como Caio Rodrigo de Assis que contribuiu significativamente para o desenvolvimento desta pesquisa, tornando os dias de bancada mais leves e produtivos, levarei sua amizade sempre comigo, grande amigo.

Aos professores Dr. Francisco Humberto Xavier Júnior e Antonio Alves de Melo Filho, pela instrução, ensinamentos valiosos e o precioso tempo investido no objetivo de me ajudarem a alcançar o título de doutor em Biotecnologia, muito obrigado.

Ao professor Jorge Neves que me orientou na primeira parte do meu projeto de pesquisa, contribuindo grandemente para o meu desenvolvimento acadêmico.

As queridas Dra. Rose, Edineuza, Gervilane e Claudinha agradeço o apoio, companhia e ajuda nos dias em que estive no Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia.

Aos amigos irmãos que escolhi Silvio, Elizabeth e Maria Clarisnete por ouvirem minhas lamentações, pelos conselhos e incentivo nos momentos difíceis de cansaço, obrigado!

Aos senhores Francisco e Dona Maria, que gentilmente me ajudaram nos dias de coleta das folhas de *Siparuna guianensis* Aubl., vocês tiveram papel fundamental no desenvolvimento desta pesquisa. Muito obrigado por sua hospitalidade e bondade!

Ao meu companheiro e amigo Felipe Anderson Pessoa de Freitas, por estar comigo em todos os momentos do desenvolvimento deste trabalho me dando apoio, força e coragem.

As inestimáveis instituições, Universidade Federal do Amazonas, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Universidade Federal do Pernambuco me proporcionar a oportunidade de desenvolver esta pesquisa.

Aos órgãos de fomento CAPES e FAPEAM pela bolsa concedida e financiamento do projeto os quais seriam imprescindíveis para o seu desenvolvimento, grato!

*No meio da dificuldade encontra-se a oportunidade.*

Albert Einstein

## RESUMO

O aumento da expectativa de vida da população, de países desenvolvidos e em desenvolvimento, tem sido a principal causa do aumento no número de diagnósticos de doença de Alzheimer (DA) cuja evolução provoca a perda progressiva e irreversível dos neurônios que formam o hipocampo. O principal tratamento da DA envolve o uso inibidores da enzima acetilcolinesterase (AChE) com o objetivo de manter as concentrações ideais do neurotransmissor acetilcolina na fenda sináptica e assim reestabelecer as sinapses entre os neurônios. A planta popularmente conhecida como "negramina", pertencente à família Siparunaceae, produz um óleo essencial que apresenta diversas atividades biológicas, entre elas, a capacidade de inibir a AChE. Uma forma de aumentar a eficácia dos inibidores da AChE e realizar seu transporte às células alvo transpondo as barreiras cerebrais é o emprego de técnicas nanotecnológicas. Por fim, o modelo *in vivo* utilizando o nematódeo *Caenorhabditis elegans* é uma ferramenta eficaz para avaliar mecanismos de ação e realizar a triagem de substâncias neuroprotetoras para o tratamento de doenças neurodegenerativas. Portanto, o objetivo deste trabalho foi realizar um estudo de interação entre o óleo essencial da planta *Siparuna guianensis* Aubl. (OESG) e a AChE bem como produzir nanocápsulas de PLGA revestidas com quitosana (NCSG) a fim de potencializar sua ação inibitória além de avaliar sua atividade protetora em modelos de Alzheimer utilizando o nematódeo *C. elegans*. O óleo essencial foi extraído das folhas frescas coletadas no estado de Roraima, extremo norte da Amazônia. A composição química do óleo essencial foi caracterizada por meio de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (GC-MS) e detector de ionização de chama (CG-FID). A interação entre o óleo essencial e a AChE foi investigada por meio de técnicas espectroscópicas como RMN <sup>1</sup>, titulação de supressão de fluorescência, métodos colorimétricos e ancoragem molecular. As nanocápsulas foram produzidas por meio de nanoprecipitação e caracterizadas utilizando um analisador de partículas ZetaSizer. A estabilidade do nanossistema foi avaliada durante 30 dias de armazenamento à 25°C. A atividade antioxidante foi avaliada por meio dos ensaios de capacidade antioxidante total, poder redutor e sequestro do radical livre DPPH. Os ensaios *in vivo* foram realizados por meio de modelos experimentais utilizando o nematódeo *C. elegans*. Os sesquiterpenoides shyobunona, iso-shyobunona e epi-shyobunona foram identificados e correspondem a mais de 40% da concentração do óleo essencial. Em relação a supressão de fluorescência, os valores obtidos das constantes de Stern-Volmer para as temperaturas de 25, 30 e 35 °C foram  $7.06 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$ ,  $1.1 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$  e  $0.06 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$ , respectivamente. A reação foi caracterizada como supressão estática. Os espectros obtidos com a titulação em RMN <sup>1</sup>H sugerem uma blindagem dos hidrogênios da shyobunona durante o contato com a AChE, indicando uma possível interação entre a enzima e a shyobunona. Os resultados espectrofotométricos revelaram que a shyobunona e seus derivados se ligam muito fortemente a AChE em um mecanismo inibidor não-competitivo e os estudos de interação apoiam os achados da inibição da enzima. O experimento *in silico* de ancoragem molecular mostrou que a maioria das moléculas se ligam ligeiramente mais forte no local A, com interações hidrofóbicas persistentes com Trp108 e Tyr355. As nanocápsulas de PLGA contendo o OESG exibiram um diâmetro de partícula de  $255 \pm 1,44 \text{ nm}$ , com índice de polidispersividade de  $0,192 \pm 0,35$  e potencial Zeta  $-10,5 \pm 0,44 \text{ mV}$ , sendo estáveis durante 30 dias de análises. As nanocápsulas de PLGA contendo o OESG revestidas com quitosana exibiram um diâmetro de partícula de  $112,8 \pm 0,51 \text{ nm}$ , com índice de polidispersividade de  $0,342 \pm 0,036$  e potencial Zeta  $26,5 \pm 0,95 \text{ mV}$ . Os resultados sugerem que OESG apresentou atividade antioxidante e anticolinesterásico *in vitro* e *in vivo*, sendo que as NCSG foram mais eficazes, porém não foi observado nenhum efeito contra o estresse proteotóxico. Decerto, o nanoencapsulamento eficaz do OESG sugerem que produtos naturais como óleos essenciais podem ter seu efeito terapêutico potencializado, fornecendo novos insights para desenvolver estratégias de tratamento para doença neurodegenerativas como a DA.

**Palavras-chave:** *Siparuna guianensis* Aubl. Nanotecnologia. Shyobunona. Acetilcolinesterase. Doença de Alzheimer.

## ABSTRACT

The increase in life expectancy of the population of countries developed and in development, has been the main cause of the increase in the number of diagnoses of Alzheimer's disease (AD) whose evolution causes the progressive and irreversible loss of neurons that form the hippocampus. The main treatment of AD involves the use of inhibitors of the enzyme acetylcholinesterase (AChE) to maintain optimal concentrations of the neurotransmitter acetylcholine in the synaptic cleft and thus reestablish synapses between neurons. The plant popularly known as "negramina", belonging to the Siparunaceae family, produces an essential oil that has several biological activities, including the ability to inhibit AChE. One way to increase the effectiveness of AChE inhibitors and carry out their transport to target cells overcoming brain barriers is the use of nanotechnological techniques. Finally, the *in vivo* model using the nematode *Caenorhabditis elegans* is an effective tool to evaluate mechanisms of action and perform the screening of neuroprotective substances for the treatment of neurodegenerative diseases. Therefore, the objective of this work was to carry out an interaction study between the essential oil of the plant *Siparuna guianensis* Aubl. (OESG) and AChE as well as producing chitosan-coated PLGA nanocapsules (NCSG) in order to potentiate their inhibitory action in addition to evaluating their protective activity in Alzheimer models using the nematode *C. elegans*. The essential oil was extracted from fresh leaves collected in the state of Roraima, in the extreme north of the Amazon. The chemical composition of the essential oil was characterized by means of gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS) and flame ionization detector (CG-FID). The interaction between the essential oil and the enzyme was investigated using spectroscopic techniques such as <sup>1</sup>H NMR and fluorescence suppression titration at 25, 30 and 35 °C, in addition to colorimetric methods and molecular docking. The nanocapsules were produced by means of nanoprecipitation and characterized using a ZetaSizer particle analyzer. The stability of the nanosystem was evaluated during 30 days of storage at 25°C. The sesquiterpenoid shyobunone and its derivatives were identified as the major components, corresponding to more than 40% of the essential oil concentration. Regarding fluorescence suppression, the values obtained for the Stern-Volmer constants for temperatures of 25, 30 and 35 °C were 7.06 10<sup>6</sup> M<sup>-1</sup>, 1.1 10<sup>6</sup> M<sup>-1</sup> and 0.06 10<sup>6</sup> M<sup>-1</sup>, respectively. The reaction was characterized as static suppression. The spectra obtained with the <sup>1</sup>H NMR titration suggest a shielding of shyobunone hydrogens during contact with AChE, indicating a possible interaction between the enzyme and shyobunone. Spectrophotometric results revealed that shyobunone and its derivatives bind very strongly to AChE in a competitive inhibitory mechanism and interaction studies support the findings of enzyme inhibition. The *in silico* molecular docking experiment showed that most molecules bind slightly stronger at the A site, with persistent hydrophobic interactions with Trp108 and Tyr355. The PLGA nanocapsules containing the OESG exhibited a particle diameter of 255 ± 1.44 nm, with a polydispersity index of 0.192 ± 0.35 and Zeta potential -10.5 ± 0.44 mV, being stable during 30 days of analysis. PLGA nanocapsules containing OESG coated with chitosan exhibited a particle diameter of 112.8 ± 0.51 nm, with a polydispersity index of 0.342 ± 0.036 and a Zeta potential of 26.5 ± 0.95 mV. The results of this research suggests that OESG showed antioxidant and anticholinesterase activity *in vitro* and *in vivo*, with NCSG being more effective, but no effect against proteotoxic stress was observed. Certainly, the effective nanoencapsulation of OESG suggests that natural products such as essential oils can have their therapeutic effect potentiated, providing new insights to develop treatment strategies for neurodegenerative diseases such as AD.

**Keywords:** *Siparuna guianensis* Aubl. Nanotechnology. Shyobunone. Acetylcholinesterase. Alzheimer's disease.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Ação da acetilcolina (ACh) na passagem dos impulsos nervosos entre as células neurais.....	22
Figura 2 - Ilustração de um neurônio saudável/afetado pelo Alzheimer.....	23
Figura 3 - Formação de oligômeros a partir do peptídeo A $\beta$ .....	24
Figura 4 - Formação celular da barreira hematoencefálica.....	27
Figura 5 - Formação e fisiologia da Barreira Sangue-líquido Cefalorraquidiano e o fluxo de Líquido Cefalorraquidiano.....	30
Figura 6 - a) fármaco dissolvido no núcleo oleoso das nanocápsulas; b) fármaco adsorvido à parede polimérica das nanocápsulas; c) fármaco retido na matriz polimérica das nanoesferas; d) fármaco adsorvido ou disperso molecularmente na matriz polimérica das nanoesferas.....	35
Figura 7 - Rotas de transporte através da barreira hematoencefálica (BBB ou BHE). Nota: As linhas verdes indicam junções apertadas; as caixas azuis indicam transporte sem suporte ou mediado pelo receptor. Abreviaturas: RMT, transcitose mediada pelo receptor; AMT, transcitose mediada por adsorção.....	38
Figura 8 - Ocorrência das espécies do gênero <i>Siparuna</i> Aubl. e <i>Glossocalyx</i> Benth.....	50
Figura 9 - Arbusto da <i>Siparuna guianensis</i> Aubl. encontrada na região do Cantá-RR.....	51
Figura 10 - Representação esquemática da rota do mevalonato.....	54
Figura 11 - Principais terpenóides recorrentes na composição química dos óleos essenciais.....	55
Figura 12 - Representação dos sítios de ligação da enzima acetilcolinesterase.....	59
Figura 13 - Representação esquemática da hidrólise da acetilcolina pela enzima acetilcolinesterase.....	60
Figura 14 - Gráfico de supressão de fluorescência.....	61
Figura 15 - Anatomia de um hermafrodita adulto.....	63
Figura 16 - Ciclo de vida do <i>C. elegans</i> a 22 °C.....	64
Figura 17 - A proteção do SCP-Oil contra danos induzidos por A $\beta$ .....	66

Figura 18 - Folhas frescas de <i>Siparuna guianensis</i> Aubl. coletadas para extração.....	69
Figura 19 - Hidrodestilação das folhas frescas de <i>Siparuna guianensis</i> Aubl. utilizando um Clevenger.....	70
Figura 20. Efeito dos compostos majoritários do OESG (shyobunona/derivados) sobre a atividade de AChE. ....	78
Figura 21 - Cinética de inibição de AChE na presença do óleo essencial de <i>Siparuna guianensis</i> Aubl.....	79
Figura 22 – Gráficos de supressão de fluorescência da interação entre o OESG e a AChE.....	80
Figura 23 - Gráficos de Stern-Volmer.....	81
Figura 24 - Gráficos obtidos pela titulação do OESG na presença de AChE .....	82
Figura 25 – Espectro de RMN <sup>1</sup> H da titulação da AChE.....	83
Figura 26 - Estrutura do ccAChE mostrando os dois locais de ligação localizados nos trechos de atracação. ....	85
Figura 27 – Efeito do OESG sobre o poder redutor.....	93
Figura 28 - Capacidade de sequestro do radical livre DPPH do OESG.....	94
Figura 29 – Efeito do OESG na sobrevivência em <i>C. elegans</i> .....	96
Figura 30 – Efeito do OESG sobre a resistência ao estresse oxidativo em <i>C. elegans</i> .....	97
Figura 31 - Quantificação de Espécies reativas de oxigênio intracelular (ERO`s), no modelo <i>C. elegans</i> .....	98
Figura 32 – Efeito das OESG sobre a AChE do homogenato do <i>C. elegans</i> em porcentagem....	100
Figura 33 - Efeito do tratamento com OESG sobre o fenótipo de paralisia induzida por Aldicarb.....	102
Figura 34 - Efeito do tratamento com o OESG na paralisia induzida por $\beta$ -amilóide em modelos transgênicos de <i>C. elegans</i> da doença de Alzheimer.....	104
Figura 35 - Nanocápsulas poliméricas biodegradáveis contendo o OESG.....	110
Figura 36 - Tamanho de partícula das NCSG produzidas no Planejamento Experimental .....	112
Figura 37 - Potencial Zeta das NCSG produzidas no Planejamento Experimental.....	112

Figura 38 - Gráficos da superfície de resposta plotados com os resultados da caracterização das nanocápsulas.....	112
Figura 39 - Distribuição de diâmetro médio das nanocápsulas de PLGA.....	113
Figura 40 - Monitoramento da estabilidade das nanocápsulas poliméricas contendo OESG.....	114
Figura 41 - Distribuição de diâmetro médio das nanocápsulas de PLGA revestidas com quitosana.....	117
Figura 42 - Distribuição de Potencial Zeta das nanocápsulas de PLGA revestidas com quitosana.....	118
Figura 43 - Distribuição de diâmetro médio das nanocápsulas de PLGA revestidas com quitosana e marcadas com Nile red.....	118
Figura 44 - Distribuição de Potencial Zeta das nanocápsulas de PLGA revestidas com quitosana e marcadas com Nile red.....	119
Figura 45 - Efeito do NCSG sobre a resistência ao estresse oxidativo em <i>C. elegans</i> .....	121
Figura 46 - Quantificação de Espécies reativas de oxigênio intracelular (ERO`s), no modelo <i>C. elegans</i> .....	122
Figura 47 - Efeito do NCSG sobre a AChE do homogenato do <i>C. elegans</i> em porcentagem.....	124
Figura 48 - Efeito do tratamento com NCSG sobre o fenótipo de paralisia induzida por Aldicarb.....	125
Figura 49 - Efeito do tratamento com NCSG sobre o fenótipo de paralisia.....	127

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Classificação de terpenos quanto ao número de isoprenos.....	53
Tabela 2 - Constituintes químicos identificados no OESG, destacando em negrito os principais componentes.....	75
Tabela 3 - Inibição média exercida pelo OESG sobre a AChE do extrato bruto de <i>C. rhizophorae</i> e <i>L. vannamei</i> .....	76
Tabela 4 - Valores de IC <sub>20</sub> e IC <sub>50</sub> relacionados à exposição <i>in vitro</i> de AChE de três tipos de organismos aquáticos (molusco, crustáceo e peixe) a shyobunona e derivados do OESG (45,5%).....	77
Tabela 5 - Constante de Stern-Volmer (K <sub>SV</sub> ) e constante de ligação (K <sub>a</sub> ) em temperaturas diferentes.....	82
Tabela 6 - Mudanças químicas de prótons causadas após interações.....	84
Tabela 7 - Resultados relevantes do AutoDock Vina.....	86
Tabela 8 - Determinação da Concentração Inibitória Mínima (MIC) do OESG contra <i>E. coli</i> OP50.....	95
Tabela 9 - Planejamento experimental para produção de nanocápsulas contendo OESG.....	109
Tabela 10 - Caracterização físico-química das dispersões coloidais geradas no planejamento experimental.....	111

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

**DA:** Doença de Alzheimer

**ACh:** Acetilcolina

**AChE:** Acetilcolinesterase

**OE:** Óleo Essencial

**OESG:** Óleo essencial da planta *Siparuna guianensis* Aubl.

**NCSG:** Nanocápsulas poliméricas biodegradáveis contendo o óleo essencial de *Siparuna guianensis*

**DMSO:** Dimetilsulfóxido

**EI:** Complexo Enzima-Inibidor

**ES:** Complexo Enzima-Substrato

**ESI:** Complexo Enzima-Substrato-Inibidor

**Glu:** Aminoácido glutamato

**Gly:** Aminoácido glicina

**I:** Inibidor

**K<sub>a</sub>:** Constantes de associação

**K<sub>i</sub>:** Constante de equilíbrio de dissociação para a ligação do inibidor com a enzima livre

**K<sub>iS</sub> =  $\alpha$ K<sub>i</sub>:** Constante de ligação do inibidor com o complexo enzima-substrato

**K<sub>m App</sub>:** Constante de Michaelis-Menten aparente

**K<sub>m</sub>:** Constante de Michaelis-Menten

**K<sub>sv</sub>:** Constante Stern-Volmer de *quenching*,

**P:** Produto

**PDB:** *Protein Data Bank*

**PDBID:** *Protein Data Bank Identification*

**Phe:** Aminoácido fenilalanina

**Q:** Concentração do supressor (*quencher*)

**S:** Substrato

**BSLCR:** Barreira sangue-líquido cefalorraquidiano

**LCR:** Líquido cefalorraquidiano

**BHE:** Barreira hematoencefálica

**IACHe:** inibidores da enzima acetilcolinesterase

**NMDA:** N-metil-D-aspartato

**ADI:** Alzheimer's Disease International

**βA:** Beta amilóide

**APP:** Proteína precursora amilóide

**PSEN1:** Presenilina-1

**PSEN2:** Presenilina-2

**GWA:** Genoma larga

**SNC:** Sistema nervoso central

**MEC:** Matriz Extracelular

**JA:** Junções apertadas

**JAE:** Junções apertadas aderentes

**OECD:** Organização para cooperação e desenvolvimento econômico

**FDA:** Food and drug administration

**EMA:** European Medicines agency

**ANVISA:** Agência Nacional de Vigilância Sanitária

**MCT:** Ministério da Ciência e Tecnologia

**MCTI:** Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação

**SFM:** Sistema Fagocitário mononuclear

**PLGA:** Ácido Lático-co-glicólico

**HSA:** Albumina de Soro Humano

**PEG:** Polietileno Glicol

**PELGE:** Monometoxi (polietilenoglicol)poli (ácido lático – co – ácido glicólico)

**PNPMF:** Política Nacional de plantas medicinais e fitoterápicos

**PLA:** Ácido Polilático

**IPP:** Pirofosfato de isopentenila

**DMAPP:** Pirofosfato de dimetilalila

**MEP:** Metileritritol fosfato

**AcSCoA:** Acetilcoenzima A

**ApoE:** apoliproteína

## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>17</b>
<b>1 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....</b>	<b>20</b>
1.1 Doença de Alzheimer.....	20
1.2 Barreiras Cerebrais.....	25
1.2.1 Barreira hematoencefálica.....	25
1.2.2 Barreira sangue-líquido cefalorraquidiano (BSLCR).....	29
1.3 Nanociência e Nanotecnologia.....	31
1.3.1 Nanopartículas para a entrega de produtos naturais ao cérebro.....	34
1.3.2 Fatores que influenciam a passagem de nanopartículas através das barreiras cerebrais.....	37
1.3.3 Polímeros transponíveis às barreiras cerebrais.....	39
1.3.4 Tipos de sistemas propostos e mecanismos de internalização.....	41
1.4 Transportadores ABC.....	44
1.5 Plantas medicinais.....	46
1.6 <i>Siparuna guianensis</i> Aubl.....	49
1.7 Óleos essenciais.....	52
1.8 Estudos de interação entre o óleo essencial e a AChE.....	56
1.9 Supressão de Fluorescência.....	58
1.10 <i>Caenorhabditis elegans</i> ( <i>C. elegans</i> ).....	62
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>67</b>
2.1 Objetivo Geral.....	67
2.2 Objetivos Específicos.....	67
<b>Capítulo 1 – Efeito inibitório do óleo essencial de <i>Siparuna guianensis</i> Aubl. contra a enzima acetilcolinesterase: insights de fluorescência, titulação de RMN <sup>1</sup>H e estudos de acoplamento molecular.....</b>	<b>69</b>
<b>3 METODOLOGIA.....</b>	<b>69</b>
3.1 Material Vegetal.....	69
3.2 Extração do óleo essencial.....	69
3.3 Composição química do óleo essencial.....	71
3.3.1 Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de massas (CG-EM).....	71
3.3.2 Cromatografia Gasosa de Alta Resolução (CG-FID).....	71
3.4 Inibição da acetilcolinesterase.....	72
3.4.1 Obtenção das enzimas.....	72
3.4.2 Atividade enzimática.....	72
3.4.3 Ensaio de inibição.....	72
3.5 Titulação de supressão de fluorescência.....	73
3.6 Titulação em RMN <sup>1</sup> H.....	74
3.7 Acoplamento molecular.....	74
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>75</b>
4.1. Composição Química.....	75
4.2 Ensaio Enzimático.....	76
4.3 Mecanismo e tipo de inibição do óleo essencial.....	78
4.4 Titulação por supressão de fluorescência.....	80

4.5 Titulação em $^1\text{H}$ RMN.....	82
4.6 <i>Docking</i> Molecular.....	84
<b>Capítulo 2 – Capítulo 2: Avaliação da atividade protetora do óleo essencial de <i>Siparuna guianensis</i> Aubl. utilizando o modelo <i>in vivo</i> <i>Caenorhabditis elegans</i>.....</b>	<b>87</b>
<b>5 METODOLOGIA.....</b>	<b>87</b>
5.1 <i>Caenorhabditis elegans</i> : cepas, manutenção e sincronização.....	87
5.2 Administração do OESG.....	87
5.3. Ensaio de inibição da OP50.....	89
5.4 Ensaio de sobrevivência em <i>C. elegans</i> .....	89
5.5 Atividade Antioxidante do óleo essencial de <i>Siparuna guianensis</i> Aubl.....	89
5.5.1 Determinação da capacidade antioxidante total (CAT).....	89
5.5.2 Poder Redutor.....	89
5.5.3 DPPH.....	89
5.6 Teste de resistência ao estresse oxidativo.....	90
5.7 Quantificação de ERO intracelular.....	90
5.8 Inibição da Enzima Acetilcolinesterase em <i>C. elegans</i> .....	91
5.9 Ensaio de paralisia induzida por Aldicarb.....	91
5.10 Ensaio de paralisia induzida pelo peptídeo $\beta$ -amiloide.....	92
5.11 Análise estatística.....	92
<b>6. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>93</b>
6.1 Determinação da capacidade antioxidante total (CAT).....	93
6.2 Poder Redutor.....	96
6.3 DPPH.....	94
6.4 Inibição da OP50 pelo OESG.....	95
6.5 Ensaio de sobrevivência.....	95
6.6 Ensaio de resistência ao estresse oxidativo.....	97
6.7 Efeito do tratamento com o OESG no acúmulo de ERO intracelular.....	98
6.8 Ensaio de inibição da AChE em <i>C. elegans</i> .....	99
6.9 Ensaio de paralisia induzida por Aldicarb para determinar defeitos na transmissão sináptica em <i>C. elegans</i> .....	101
6.10 Ensaio de paralisia induzida por acúmulo da $\beta$ -amilóide em <i>C. elegans</i> .....	103
<b>Capítulo 3 – Produção de nanocápsulas poliméricas biodegradáveis contendo óleo essencial de <i>Siparuna guianensis</i> Aubl.....</b>	<b>106</b>
<b>7 METODOLOGIA.....</b>	<b>106</b>
7.1 Produção das nanocápsulas.....	106
7.2 Otimização da produção de nanocápsulas contendo <i>Siparuna guianensis</i> Aubl.....	106
7.3. Produção e otimização da produção de nanocápsulas contendo o OESG revestidas com quitosana.....	107
7.4 Nanocápsulas contendo vermelho de Nilo.....	107
7.5 Caracterização das nanocápsulas.....	107
7.6 Estabilidade das nanocápsulas.....	107
7.7 Morfologia das nanocápsulas.....	107
7.8 Atividade protetora das NSCG em modelos de <i>C. elegans</i> .....	108
7.9 Análises estatísticas.....	108
<b>8 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>109</b>
8.1 Produção e otimização da produção de nanocápsulas contendo o óleo essencial de <i>Siparuna guianensis</i> Aubl.....	109

8.2 Caracterização das nanocápsulas.....	111
8.2.1 Análise do tamanho de partícula e potencial Zeta.....	111
8.3 Estabilidade das nanocápsulas.....	115
8.4 Produção e otimização da produção de nanocápsulas contendo o OESG revestidas com quitosana.....	116
8.5 Produção e otimização das nanocápsulas contendo o OESG marcadas com Nile red.....	118
8.6 Toxicidade das NCSG em <i>C. elegans</i> .....	120
8.7 Ensaio de resistência ao estresse oxidativo.....	120
8.8 Efeito do tratamento das NCSG no acúmulo de ERO intracelular no modelo <i>C. elegans</i> .....	121
8.9 Ensaio de inibição da AChE em <i>C. elegans</i> .....	123
8.10 Ensaio de paralisia induzida por Aldicarb para determinar defeitos na transmissão sináptica em <i>C. elegans</i> .....	124
8.11 Ensaio de paralisia induzida por acúmulo da $\beta$ -amilóide em <i>C. elegans</i> .....	126
<b>9 CONCLUSÃO.....</b>	<b>128</b>
<b>10 REFERENCIAS.....</b>	<b>132</b>
<b>11 ANEXOS.....</b>	<b>158</b>

## INTRODUÇÃO

Doenças neurodegenerativas como a doença de Alzheimer (DA), mal de Parkinson, esclerose amiotrófica lateral, epilepsia, esclerose múltipla, entre outros, representam grande preocupação para a saúde pública de ordem mundial (FU; HARDY; DUFF, 2018). Muitos fatores antrópicos como a poluição, desmatamento, sedentarismo e principalmente o aumento da expectativa de vida da população de países desenvolvidos e em desenvolvimento tem contribuído diretamente para o surgimento de novos diagnósticos e números altíssimos de pessoas acometidas por algum tipo de doença neurodegenerativa. Entre estas patologias, a DA se destaca como um tipo de demência de maior incidência em todo o mundo, podendo triplicar o número de casos até o ano de 2050 (SANTOS et al, 2020; SILVA et al, 2020).

Estas doenças neurológicas caracterizam-se pela perda progressiva e irreversível dos neurônios, células nervosas responsáveis pela produção de neurotransmissores, substâncias que coordenam várias vias metabólicas no cérebro (STEPHENSON et al, 2018). A manifestação de uma doença neurodegenerativa caracteriza-se pela alteração de áreas cerebrais que refletem um conjunto específico de células e entender essa vulnerabilidade celular pode contribuir para o entendimento das bases moleculares destas patologias neuronais. Outro fator observado é a deformação de grupos de proteínas que tendem a se acumular nas células nervosas levando-as a apoptose, por isso é importante elucidar os fatores que levam a predisposição de grupos de proteínas, principalmente as insolúveis e tóxicas, a agregarem-se causando neurointoxicação e morte neuronal (SOTO; PRITZKOW, 2018).

Atualmente a DA ainda não possui sua etiologia definida e sua histopatologia caracteriza-se principalmente pela perda progressiva das funções colinérgicas (KNOPMAN et al, 2022). Além disso, o acúmulo de agregados proteicos como a  $\beta$ -amilóide que é responsável pela formação das placas senis e a hiperfosforilação da proteína Tau que leva a formação dos novos neurofibrilares e contribuem para o início precoce da DA (BUTTERFIELD; HALLIWELL, 2019). As terapias empregadas são escassas, representando complicações econômicas (alto custo dos medicamentos) e físicas (barreiras cerebrais) que dificultam o avanço do tratamento dessas doenças neurológicas. O principal tratamento da DA consiste no uso de inibidores da enzima acetilcolinesterase (IACHÉ) com o objetivo de restaurar a função colinérgica dos neurônios por meio de aumento da concentração do neurotransmissor acetilcolina na fenda sináptica. Além disso, outro medicamento

conhecido como memantina, que é um antagonista dos receptores N-metil-D-aspartato (NMDA) e tem como alvo o glutamato, um neurotransmissor que é encontrado em excesso em pacientes com DA. O glutamato se liga aos receptores NMDA fazendo com que haja uma entrada excessiva de cálcio nos neurônios levando-os a apoptose (ALZHEIMER ASSOCIATION, 2019).

Desta forma, inúmeros trabalhos encontrados na literatura concentram-se na busca por substâncias oriundas de produtos naturais de origem vegetal que possuam propriedades neuroprotetoras e sejam empregadas no tratamento de alguma doença neurodegenerativa (SENGER et al, 2017). Há muito tempo, o homem tem usado o poder terapêutico das plantas medicinais para aliviar as dores causadas por enfermidades. Existem relatos da prática fitoterapêutica na história de todas as civilizações há mais de 3000 mil anos a.C. (MARTINS; BRIJESH, 2018). O Brasil é detentor da maior biodiversidade do planeta, possuindo ampla variedade étnica e cultural, além de valioso conhecimento tradicional associado ao uso de plantas medicinais. Este fato, proporciona e incentiva o desenvolvimento de pesquisas relacionadas aos insumos oriundos da flora brasileira, tornando possível o surgimento de novos produtos, processos e tecnologias inovadoras (RIBEIRO et al, 2018).

Popularmente conhecida como negramina, a planta *Siparuna guianensis* Aubl. é uma espécie medicinal bastante abrangente em todo o território brasileiro, possuindo diversas propriedades terapêuticas relatadas em trabalhos encontrados na literatura (FERREIRA et al, 2019). Além de seu uso fitoterápico, esta erva aromática produz um óleo essencial que possui diversas atividades biológicas, entre elas, a capacidade de inibir a enzima acetilcolinesterase (AChE) cuja ação é um dos principais mecanismos de tratamento da DA (MARTINS, 2016). A composição química do óleo essencial é constituída basicamente de terpenóides e fenilpropanóides como o espatulenol, 2-undecanona, germacreno D, biciclogermacreno, siparunona,  $\alpha$ -terpinoleno,  $\alpha$ -bisabolol,  $\alpha$ -pineno, b-pineno, shyobunona, entre outros, sendo que incidência destas substâncias pode variar de acordo com a região onde a planta é encontrada devido a sua sazonalidade (ALMEIDA et al, 2021; MARTINS, 2016).

Uma forma de realizar a triagem de novas substâncias de oriundas de produtos naturais é o emprego do modelo *in vivo* que utiliza o nematódeo *Caenorhabditis elegans* (ALVAREZ et al, 2022). O *C. elegans* é um animal microscópico e transparente que possui diversos genes semelhantes aos humanos possibilitando o estudo de mecanismos envolvidos no desenvolvimento de doenças inclusive as de ordem neurológicas como a DA. Além disso, existem muitas limitações

éticas em relação ao estudo de novas substâncias e suas atividades biológicas, portando o *C. elegans* se apresenta como uma ferramenta importante para driblar esta problemática, sendo utilizado a mais de 25 anos pelo meio científico, deste que os primeiros modelos de Alzheimer começaram a surgir que superexpressam a  $\beta$ -amilóide (SHEN et al, 2018).

Existem meios de aumentar a eficácia da ação de compostos biologicamente ativos encontradas em produtos naturais de origem vegetal. Uma dessas alternativas seria sua potencialização por meio de encapsulação utilizando uma das técnicas oferecidas pela nanotecnologia farmacêutica conhecida como nanoprecipitação cujo método utiliza polímeros pré-formados capazes de incorporar principalmente compostos lipofílicos (SOUTO; SEVERINO; SANTANA, 2012). Portanto, a nanotecnologia torna-se uma grande aliada no desenvolvimento sistemas nanoestruturados capazes de carrear compostos bioativos até o sistema nervoso central, burlando o sistema fagocitário mononuclear, além de oferecer a proteção da degradação enzimática da corrente sanguínea e o mais importante: viabilizar a passagem dessas substâncias através das barreiras cerebrais como a barreira hematoencefálica (BHE) e a barreira sangue líquido cefalorraquidiano (BSLCF) (TAKESHITA; KANDA, 2015).

Diante do exposto acima, considerando as propriedades químicas e biológicas do óleo essencial da planta aromática *Siparuna guianensis* Aubl. (OESG) e a necessidade de realizar a transposição das barreiras cerebrais e realizar sua entrega às células alvo que formam o hipocampo, o objetivo deste trabalho foi quantificar e qualificar os principais componentes químicos do OESG, coletados durante os meses mais intensos dos períodos chuvoso, no extremo norte do Brasil. Além disso, realizar um estudo da atividade protetora utilizando modelos experimentais *in vitro*, *in sílico* e *in vivo*, bem como produzir nanocápsulas poliméricas biodegradáveis contendo o OESG e avaliar a potencial melhora da atividade antioxidante e anticolinesterásica que são um dos principais mecanismos de ação e tratamento da doença de Alzheimer.

# 1 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

## 1.1 Doença de Alzheimer

Constata-se que a doença de Alzheimer (DA) está entre as desordens neurológicas com maior incidência em todo o mundo, devido ao aumento da expectativa de vida humana e o crescimento da população idosa (HARA; MCKEEHAN; FILLIT, 2019). Este tipo de demência causa a degeneração das células cerebrais e ainda não há uma causa específica, apenas hipóteses foram elaboradas por meio de inúmeras pesquisas científicas cujo objetivo é buscar de inovações tecnológicas farmacêuticas para desenvolver produtos e proporcionar um melhor tratamento e até mesmo uma possível cura (REITZ, 2017). Segundo a Alzheimer's Disease International (ADI), estima-se que aproximadamente 35,6 milhões de pessoas sofrem dos sintomas causados pelo mal de Alzheimer. Ademais, constata-se que a cada 20 anos dobra os números de diagnósticos, sendo que até 2030 estes índices irão atingir um patamar aproximado de 66 milhões de indivíduos em todo o mundo (SANT'ANA et al, 2018)

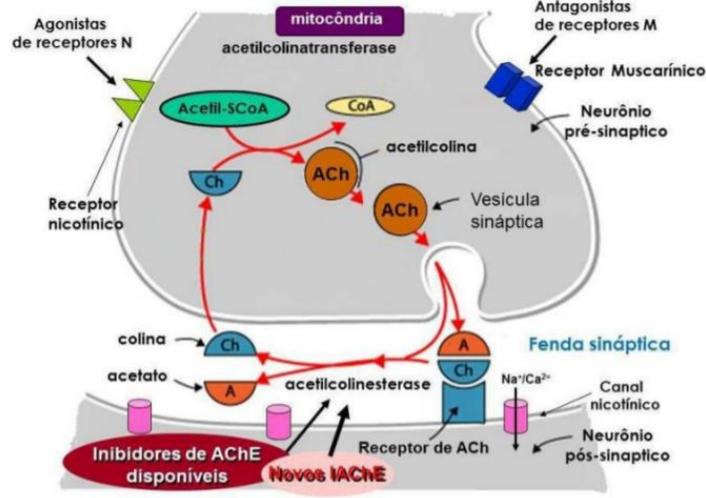
A manifestação dos primeiros sinais da DA ocorre afetando principalmente a memória recente e em seguida a capacidade de raciocínio e comunicação (TIWARI et al, 2019). Os principais sintomas estão associados à redução de neurotransmissores cerebrais como acetilcolina (ACh), noradrenalina e serotonina (FALCO et al, 2016). O tratamento para o mal de Alzheimer é sintomático e consiste basicamente na tentativa de restauração da função colinérgica, sendo amplamente utilizados para este fim os inibidores de acetilcolinesterase (AChE). Por isso, diversas pesquisas científicas envolvendo produtos naturais foram desenvolvidas na tentativa de encontrar novos compostos que sejam capazes de inibir a enzima acetilcolinesterase e até mesmo atuar em outras rotas de desenvolvimento da doença. O custo dos medicamentos existentes disponíveis no mercado é relativamente alto, por isso, novos inibidores oriundos de produtos naturais representam uma fonte alternativa interessante, pois estes poderiam ser economicamente mais viáveis além de apresentarem menos efeitos colaterais (DEY et al, 2017).

A etiologia da DA ainda é desconhecida sendo que alguns fatores físicos e genéticos foram observados e parecem contribuir para a evolução da doença. As características histopatológicas apresentadas pela DA são a perda sináptica, o acúmulo do peptídeo beta-amilóide ( $\beta$ A), formação das placas neuríticas, deposição de emaranhados neurofibrilares associados a proteína Tau, perda

das sinapses e apoptose das células nervosas e em determinadas áreas do cérebro (MULLANEY; WILLIAMS, 2018; HENSTRIDGE; HYMAN; SPIERS-JONES, 2019). Existem algumas hipóteses bastante discutidas na literatura sobre a causa da DA, porém nenhuma delas foi capaz de elucidar o motivo pelo qual a doença surge e se desenvolve. A hipótese colinérgica é a mais antiga, sendo discutida e fundamentada no início dos anos 80 consistindo na perda das sinapses entre os neurônios por meio da diminuição de um importante neurotransmissor, a acetilcolina. A segunda hipótese, e talvez a mais importante, é a da cascata amilóide que aborda a formação e o acúmulo do peptídeo beta-amilóide causador de diversas desordens no sistema nervoso central. Por fim, a hipótese mais recentemente descoberta e discutida foi a hipótese glutamatérgica, cuja postulação se deu ainda no início do século XXI (SPUCH; SAIDA; NAVARRO, 2012).

A hipótese colinérgica consiste na diminuição da produção neural do neurotransmissor a acetilcolina e por tanto, a perda das sinapses entre as células nervosas (DALMAGRO; CAZARIN; DOS SANTOS ZENAIDE, 2020). A acetilcolina (ACh) é encontrada em vertebrados e alguns artrópodes, sendo um dos principais compostos cujos impulsos elétricos são conduzidos por células nervosas, transmitidos para outras células nervosas ou para músculos voluntários ou involuntários. ACh é armazenada nos terminais nervosos em estruturas chamadas vesículas sinápticas, quando o terminal do nervo é despolarizado a vesícula libera essas substâncias a partir das terminações nervosas e em seguida a ACh entra na sinapse e se liga ao receptor conforme demonstra a Figura 1 (HAMPEL et al, 2019). A enzima acetilcolinesterase (AChE) hidrolisa a ligação éster na molécula do ACh tornando seu período curto e levando a perda de sua atividade estimuladora. Portanto a inibição da AChE prolonga o tempo de vida da ACh e permite o funcionamento dos impulsos nervosos conduzidos pelas células nervosas e conseqüentemente melhoras significativas no tratamento DA (HAMPEL et al, 2019; STANCIU et al, 2020).

Figura 1 - Ação da acetilcolina (ACh) na passagem dos impulsos nervosos entre as células neurais

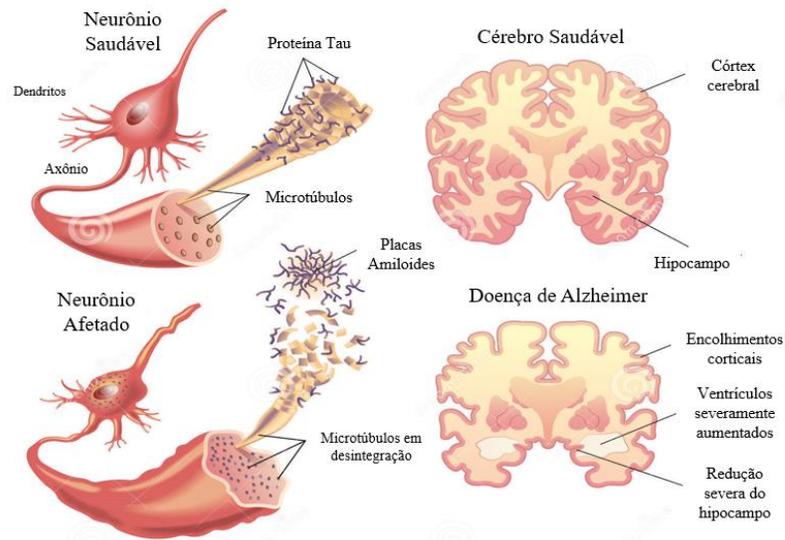


Fonte: Dias (2016).

Uma hipótese importante a ser considerada em relação a progressão do mal de Alzheimer é a agregação e deposição da substância  $\beta$ -amilóide ( $A\beta$ ) em células nervosas (TAKANO et al, 2018). Este fator conseqüentemente da origem a formação das placas senis cuja ação impede que ocorra as conexões necessárias para a sinapse e impulsos nervosos entre os neurônios. O peptídeo  $\beta$ -amilóide é formado devido a clivagem proteolítica da proteína precursora amilóide (APP) cuja toxicidade leva apoptose das células nervosas (TAKAHASHI-ITO et al, 2017). A agregação dessa proteína é considerada o principal fator da hipótese da cascata amilóide, pois em cérebros de indivíduos portadores da DA existe uma relação direta entre a severidade da demência e a perda cognitiva e a presença das placas senis e novos neurofibrilares (BROWN; PEIFFER; RAINEY-SMITH, 2019; VARMA; VERMA; CHAUDHARY, 2019).

Essas lesões filamentosas extraneuronais ocorrem no córtex cerebral e límbico e esses agregados anormais do peptídeo  $A\beta$  envolvem emaranhados fibrilares, dendritos e axônios causando sintomas das chamadas neurites distróficas afetando gravemente as células do sistema nervoso central como mostra a Figura 2 (SHARMA et al, 2019).

Figura 2 - Ilustração de um neurônio saudável/afetado pelo Alzheimer



Fonte: Adaptado de Dias (2016).

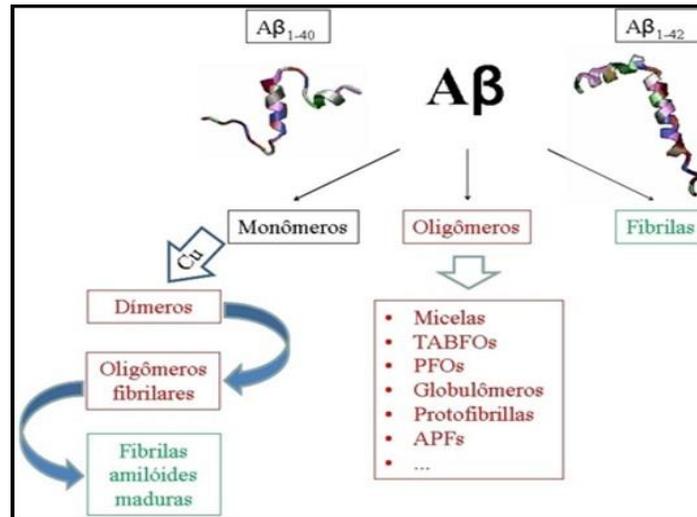
Uma descoberta inovadora foi a transmissão autossômica dominante dos genes que codificam a mutação da APP e consequentemente formação do peptídeo A $\beta$  o que motivou a comunidade científica a buscar novas ideias a respeito da etiologia da DA (RICCIARELLI; FEDELE, 2017). Conforme os estudos de KARRAN e colaboradores (2011) a mutação que foi descrita estava no gene que codifica para APP, a holoproteína a partir da qual o péptido beta-amilóide é excisado através de cisão sequencial pela enzima de clivagem de  $\beta$ -APP (BACE) e  $\gamma$ -secretase. Estes fatores juntamente com a observação de mutações autossômicas dominantes na presenilina 1 (PSEN1) e PSEN2, ambas proteínas homólogas que podem formar o sítio catalítico ativo da  $\gamma$ -secretase contribuíram para a articulação sobre a hipótese da cascata amilóide (DOURLIN et al, 2019).

Outros genes que representam fatores de risco na incidência da doença de Alzheimer continuam a serem estudados em pesquisas realizadas pela associação genoma-larga (GWA). Contudo, afirmar que o risco da Doença de Alzheimer é causado por uma variação ou mutação genética não é o suficiente para elucidar as questões em torno da etiologia dessa patologia neurodegenerativa (GALLARDO; HOLTZMAN, 2019).

O acúmulo do peptídeo A $\beta$  no espaço extracelular devido a mutação sofrida pela APP é dos sinais apresentados no decorrer da evolução da AD. Infelizmente, na década de 90 descobriu-se

que, além de formar novos neurofibrilares e as placas senis, o peptídeo A $\beta$  também é capaz de se aglomerar e formar oligômeros solúveis como demonstra a Figura 3 (XIA et al, 2016).

Figura 3 - Formação de oligômeros a partir do peptídeo A $\beta$



Fonte: adaptado de Xia et al (2016).

As formas oligoméricas da A $\beta$  afetam neurônios e células gliais, ocasionando consequências como estresse oxidativo, desregulação do metabolismo do cálcio, disfunção mitocondrial e fosforilação da proteína Tau e, como resultado, atrofia dendrítica e morte neuronal ou afetam a transmissão sináptica. Entender os fatores que regulam os níveis de A $\beta$  solúveis e de fosforilação da Tau é essencial para elucidar a patogênese da doença (MAEDA; TAKASHIMA, 2019).

A clivagem final através da  $\gamma$ -secretase da APP (precursor da proteína amilóide) determina o tamanho dos peptídeos A $\beta$  e as formas oligoméricas da  $\beta$ -amilóide, por meio de diversos bioensaios, tem demonstrado sua toxicidade quando aplicados a neurônios primários de ratos em cultura. Esta forma solúvel da  $\beta$ -amilóide contribui simultaneamente com a forma insolúvel que fundamenta a cascata amilóide para a evolução da doença de Alzheimer (CASTELLANI; PLASCENCIA-VILLA; PERRY, 2019; MAEDA; TAKASHIMA, 2019).

Inúmeros transtornos neurodegenerativos são causados pela clivagem da APP e conseqüentemente formação e deposição do peptídeo  $\beta$ -amilóide. Além disso, seu acúmulo formam os novos neurofibrilares que se emaranham nos dendritos e axônios das células nervosas e outras formas do solúveis A $\beta$  (peptídeos oligômeros) são produzidos na quebra dessas proteínas

podendo exibir uma característica tóxica provocando estresse oxidativo ao SCN (FALCO et al, 2016). Há ainda uma característica citotóxica que seria em decorrência à presença de íons metálicos com atividade redox ( $\text{Cu}^{2+}$  e  $\text{Fe}^{3+}$ , além de certos íons não redox-ativos, como o  $\text{Zn}^{2+}$ ) que propiciam a agregação da A $\beta$  e evolução de doenças de ordem degenerativa (LIANG et al, 2015).

Segundo Liang et al (2015), descobriu-se em 1994 que A $\beta$  se torna amiloidogênico em reação a quantidades estequiométricas de  $\text{Zn}^{2+}$  e  $\text{Cu}^{2+}$ . Nos anos seguintes, tornou-se claro que A $\beta$  é uma metaloproteína e que a fonte intrínseca do cérebro de  $\text{Cu}^{2+}$  e  $\text{Zn}^{2+}$  (e possivelmente  $\text{Fe}^{3+}$ ) medeia a toxicidade do peptídeo por meio da produção e agregação de radicais e peróxido de hidrogênio. Foi observado primeiro que A $\beta$  é rapidamente precipitado por  $\text{Zn}^{2+}$  e tanto  $\text{Cu}^{2+}$  como  $\text{Fe}^{3+}$  também induzem agregação da A $\beta$ , mas apenas sob condições ligeiramente ácidas (por exemplo, pH 6,8-7,0) tais como as dos cérebros de pacientes com DA. O  $\text{Cu}^{2+}$  precipita A $\beta$  de forma mais robusta que as concentrações de  $\text{Fe}^{3+}$ , e mesmo de traço (nanomolar) de  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  ou  $\text{Fe}^{3+}$  em tampões de laboratório comuns são suficientes para induzir a nucleação de A $\beta$ , que pode então levar a fibrilação da solução peptídica.

A formação dessas placas amiloides extracelulares contendo  $\text{Cu}^{2+}$  e  $\text{Zn}^{2+}$  são característicos de indivíduos que sofrem de Alzheimer cuja consequência são células neurais deficientes desses íons. Portanto, a hipótese metálica se tornou importante para histopatológica do DA devido a necessidade de novas pesquisas afim de produzir agentes quelantes de metais capazes de conduzir a dissolução dos novos neurofibrilares e as placas senis que são constituídos do peptídeo A $\beta$  bem como evitar a interação com essas proteínas (KEPP, 2017). Um dos agentes quelantes de metais produzidos e eficazes de modular ou conduzir os íons  $\text{Cu}^{2+}$  e  $\text{Zn}^{2+}$  no cérebro foi o 5-cloro-7-iodo-quinolin-8-ol (clioquinol, CQ) que promoveu a captação celular do  $\text{Cu}^{2+}$  e  $\text{Zn}^{2+}$  sinalizando células protetoras para degradar o  $\beta$ -amilóide e prevenir a toxicidade causada por essa proteína ionizada (KEPP, 2017; YOUNG, 2018).

## 1.2 Barreiras Cerebrais

### 1.2.1 Barreira hematoencefálica

Descoberta pelo cientista Paul Ehrlich no século XIX, a barreira hematoencefálica (BHE) é um importante mecanismo de interface que liga o Sistema Nervoso Central (SNC) com o resto

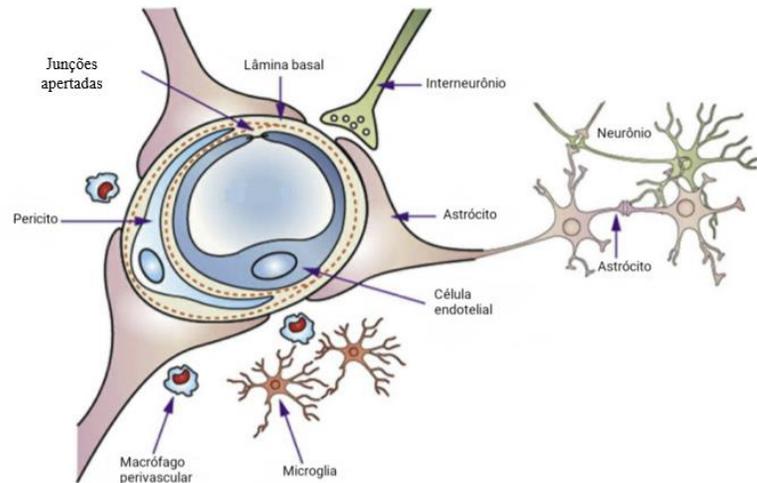
do organismo regulando e/ou limitando a passagem de substâncias transportadas através da corrente sanguínea (DE LANGE, 2012). Paul utilizou marcadores (corantes) os quais injetou na corrente sanguínea e arterial de animais onde posteriormente observou uma coloração diferente nos tecidos de todos os órgãos desses animais exceto no cérebro e na medula espinhal, constatando a presença de alguma espécie de barreira que impedia que certas substâncias chegassem até eles. Posteriormente, Edwin Goldmann (aluno de Ehrlich) e Peter Medawar realizaram estudos semelhantes e constataram que o cérebro possui um comportamento anatomicamente isolado, pois Edwin injetando o corante diretamente no fluido cérebro espinhal percebeu que ocorria o contrário, os órgãos periféricos permaneceram intactos enquanto todo o SNC ficou manchado e Peter forneceu algumas das primeiras evidências experimentais indicando que o cérebro poderia não ser um local imunologicamente intacto (NAKAGAWA; NIWA, 2009). Por fim, segundo Louveau et al (2015), Antoine Louveau provou a ligação entre o corpo e o cérebro através da descoberta de vasos linfáticos no SNC.

Constata-se que o número de enfermidades acometidas por desordens no sistema nervoso central vem aumentando ao longo dos anos e o número indivíduos afetados por essas doenças neurodegenerativas representam um enorme quantitativo em relação as demais patologias (SOUZA et al, 2021). Existe vários fatores que contribuem para este aumento, como por exemplo, aumento da expectativa de vida, obesidade e ainda existem indícios ligados a poluição causada pelo homem. E o tratamento destas enfermidades se tornam problemáticas devido a a administração de fármacos direcionados ao SNC que não são locais e, portanto, se tornam ineficazes apesar de serem comprovadamente potentes agentes neuroprotetores (GULART et al, 2021). Apenas alguns podem fornecer aplicações humanas seguras devido a presença de barreiras que regulam a entrada de substâncias através da corrente sanguínea como a barreira hematoencefálica (BHE) e a barreira sangue líquido cefalorraquidiano (BSLCR) (MISRA et al, 2003; PROFACI et al, 2020)

A BHE é uma membrana lipofílica localizada constituída de células endoteliais, ocludinas, claudinas, astrócitos, pericito e a matriz extracelular (MEC) que em conjunto impedem ou dificultam a passagem macromoléculas, anticorpos, fatores de coagulação ou substâncias que possam vir a causar problemas ao SNC (RODA et al, 2014). As células endoteliais que formam a BHE apresentam-se alinhadas com os capilares cerebrais e são conectadas por junções apertadas que controlam o fluxo em massa de água e solutos conferindo baixa permeabilidade devido a forma

íntima como estão ligadas umas às outras como mostra a figura 4 (PRABHAKARPANDIAN et al, 2013).

Figura 4 - Formação celular da barreira hematoencefálica



Fonte: adaptado de Aquino (2019).

O controle da permeabilidade das junções endoteliais ocorre devido a abertura e fechamento causado pela união das células-células as quais são bastante apertadas, o que facilita o processo de escolha de substâncias exógenas e endógenas presentes na corrente sanguínea que podem vir a ser prejudiciais ao SNC formando assim uma barreira metabólica e física (ON et al, 2013).

A característica da baixa permeabilidade da barreira é a maneira como as células endoteliais dos capilares estão associados. Em função das junções apertadas (JA) e junções apertadas aderentes (JAE), que em conjunto regulam a abertura e fechamento coordenado das junções célula-célula, o SNC e a medula cérebro espinhal ficam protegido e isolado do restante do organismo e as trocas de substâncias reguladas (GRIEP et al, 2013). Essa baixa permeabilidade é de importância clínica e fisiológica pois regula a passagem de substâncias para as células nervosas bem como medicamentos, partículas tóxicas, agentes externos (fungos, moléculas, vírus, etc.) e macromoléculas, porém a liberação de fármacos direcionados ao tratamento de desordens cerebrais se torna difícil devido a formação desta barreira (UCHIDA et al, 2011).

Ocludinas são células que contribuem com decréscimo da permeabilidade paracelular da BHE através de sua ação reguladora além de assegurar a ligação com o citoesqueleto da célula e fornecer impulsos elétricos às células endoteliais (BIANCO, 2019). São proteínas integrais do tipo

fosfoproteína de 65 kDa com quatro domínios transmembrana, ligados a duas porções extracelulares ricas em tirosina no domínio intracelular carboxi e amino terminal. As ocludinas devem ser vistas mais como agente reguladores do que apenas proteínas estruturais cuja importância é o estabelecimento das propriedades da barreira (YANG; ASCHNER, 2003).

As Claudinas, assim como as ocludinas, são proteínas integrais de 21-28 kDa com quatro domínios de membrana cujas porções extracelulares se ligam com as claudinas vizinhas das células endoteliais constituindo os primeiros impedimentos das junções apertadas (AQUINO, 2019). Através das interações heteroméricas e heterotípicas as claudinas regulam e selecionam de forma paracelular os íons pequenos presentes na corrente sanguínea (BIANCO, 2019).

Os astrócitos são células da glia em formato de estrela, cujos prolongamentos formam uma rede de lamelas próximas ao endotélio da BHE, possuindo função de controle do tônus vascular, cuja estrutura forma uma membrana para proteger o SNC de agente nocivos presentes no sangue e simultaneamente permite o funcionamento normal do encéfalo (BORGES, 2018). Os astrócitos atuam física e metabolicamente, isolam, nutrem e sustentam os neurônios e são classificados em dois grupos, protoplasmáticos e fibrosos. Os protoplasmáticos são encontrados na massa cinzenta e possuem processos que envolvem sinapses e vasos sanguíneos. Já os fibrosos estão presentes na massa branca e entram em contato com os nódulos de Ranvier e com os vasos sanguíneos (NAU; SORGEL; EIFFERT, 2010).

Um pericito se assemelha a células mesenquimais, parecidas com fibroblastos, com função de gerar estabilidade ao sistema vascular e recentemente foi descoberto que estas células também podem atuar como células-tronco. Além disso, estas células indiferenciadas estão presentes em todos os vasos sanguíneos do corpo servindo como suporte (FRAGAS, 2018).

Participam no processo de reparação de tecidos dos vasos sanguíneos, sendo também que a presença de miosina, actina e tropomiosina nos pericitos indicam uma função contrátil, responsável por auxiliar na regulação do fluxo sanguíneo. Essas células interagem com o endotélio e são importantes na formação, maturação e manutenção da BHE (JUKKOLA et al, 2013).

O cérebro é um órgão extremamente complexo e privilegiado por barreiras que o protegem e controlam a passagem de substâncias e agentes nocivos presentes na corrente sanguínea que viriam a causar danos diversos caso estes tivessem livre acesso ao sistema nervoso central, além disso, cerca 20% deste órgão é constituído de espaços extracelulares preenchidos pela MEC que

são substâncias excretadas pelas próprias células e organizada de forma eficaz nas junções apertadas das células epiteliais (AGARWAL; LIPPMANN; SHUSTA, 2010).

Segundo Bazzoni e Dejana (2004) a MEC está localizada na interface entre os vasos sanguíneos e a glia e serve de âncora com o endotélio através das interações de proteínas da MEC com os receptores endoteliais tipo integrinas que desempenham um papel fundamental na sinalização celular, migração e formação capilar cerebral durante a angiogênese. As integrinas, ligantes da matriz extracelular, estabelecem e asseguram as interações entre as células assim como a comunicação entre as células e a matriz extracelular (glicoproteínas especiais), sendo que estas moléculas apresentam grande viscosidade cuja função é a proteção celular. Tais interações célula-matriz podem estimular uma série de vias de sinalização intracelular nas células vasculares, neurônios e células gliais de apoio, além de serem essenciais na BHE porque possivelmente participe na manutenção das proteínas endoteliais nas junções apertadas.

A matriz extracelular é composta por fibras proteicas e polissacarídeos cuja formação gera uma grande viscosidade proporcionando grande resistência a compressão e tensão. Seus principais componentes são macromoléculas que fazem parte de três categorias: glicosaminoglicanos (cadeias de polissacarídeos), b proteínas fibrosas de função estrutural (colágeno e elastina) e proteínas de função adesiva (fibronectina e laminina) (BAETEN; AKASSOGLU, 2011; KANGWANTAS; PINTEAUX; PENNY, 2016).

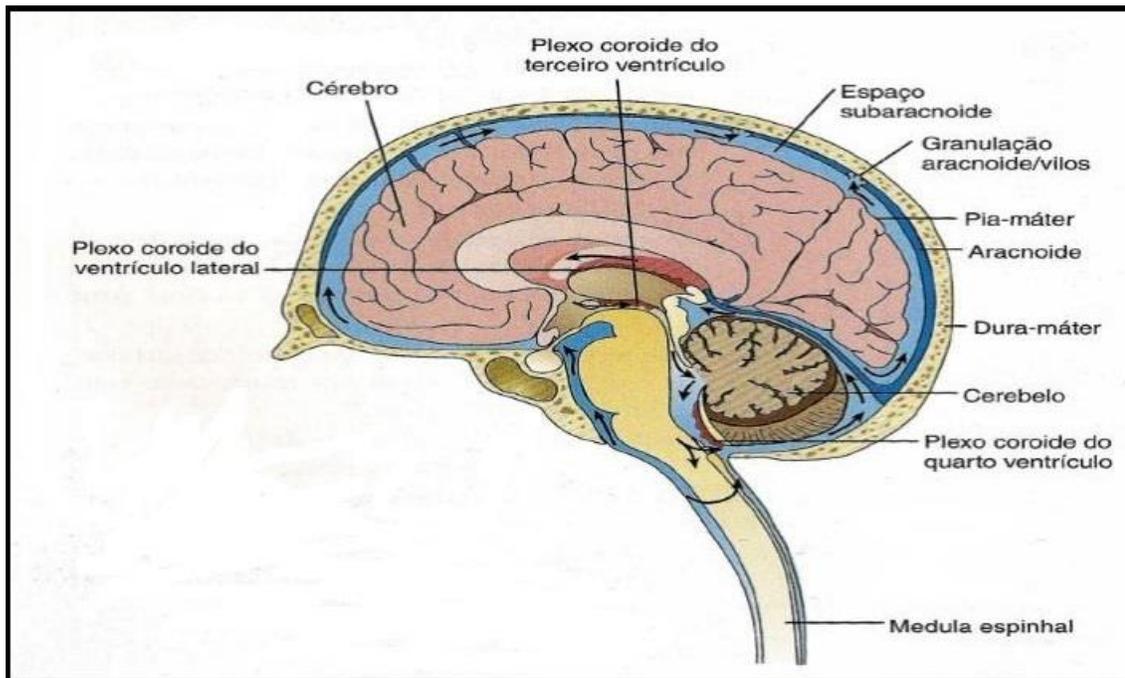
### **1.2.2 Barreira sangue-líquido cefalorraquidiano (BSLCR)**

O líquido cefalorraquidiano (LCR) ou líquido é um fluido biológico que está intimamente relacionado com o sistema nervoso central e seus envoltórios (as meninges), é um líquido que ocupa os ventrículos cerebrais, o canal central da medula e o espaço subaracnóideo e foi descoberto por Domenico Cotugno em 1974, após um consenso entre a comunidade científica da época, pois havia trabalhos sendo desenvolvidos sobre o mesmo, posteriormente, na metade do século XIX, François Magendie nomeou o LCR como líquido, pois ele foi o primeiro a descobrir um método de medição de pressão de fluido cerebrospinal e estabeleceu bases científicas para o desenvolvimento da pesquisa sobre o LCR (MAGALHÃES, 2015). O líquido é um ultrafiltrado do sangue produzido por estruturas denominadas de plexos coróides localizados nos ventrículos encefálicos. A BSLCR é a segunda barreira cerebral encontrada pelas substâncias que agem como

princípio ativo e fármacos em geral que impede a suas chegadas ao SNC (KUEHNE et al, 2013; GHISONI; LATINI, 2015). Esta barreira é formada por um fluido biológico chamado líquido cefalorraquidiano que está diretamente ligado ao Sistema Nervoso Central e o conjunto de membranas que envolvem o cérebro (meninges), sendo produzido nos plexos coróides presentes nos ventrículos cerebrais e no espaço subaracnóideo (WANG; LI; ZHENG, 2008).

O líquido cefalorraquidiano LCR fornece um sistema para fornecer nutrientes ao tecido nervoso, resíduos metabólicos e produz uma barreira mecânica protegendo cérebro e a medula espinhal contra traumas e pressão. O LCR é produzido nos plexos coróides localizados nos ventrículos cerebrais. Dentre adultos, aproximadamente 20 mL de fluido é produzido a cada hora. O fluido flui através do espaço subaracnóideo localizado entre a aracnóide e a pia-máter (Figura 5) (BECHTER et al, 2010).

Figura 5 - Formação e fisiologia da BSLCR e o fluxo de LCR através do cérebro e coluna vertebral



Fonte: Stressinger e Lorenzo (2009).

Segundo Johanson et al (2008) A formação de LCR ocorre em duas fases: filtração passiva de fluido através do endotélio capilar coroidal, seguida de uma secreção activa regulada através de um epitélio de camada única. Várias investigações caracterizaram o movimento do

soluto do sangue para o LCR por difusão. Esses estudos elucidam a natureza e a singularidade da transferência de fluidos através da barreira sangue líquido cefalorraquidiano.

Sua composição é constituída de baixas taxas de proteínas, glicose, lactato, enzimas, potássio, magnésio, concentrações elevadas de cloreto de sódio e um percentual celular de 5 células  $\text{cm}^{-3}$  sendo considerado um líquido incolor e límpido. A concentração de proteínas no LCR é de 0,40  $\text{mg dl}^{-1}$  no nível lombar e o teor de glicose depende das taxas desse monossacarídeo no plasma sanguíneo e do metabolismo do sistema nervoso central. A concentração de glicose no soro e LCR é um fator de importância no diagnóstico de doenças como meningites (de origem fúngica, bacteriana ou germes) que em decorrência destes há um consumo maior de glicose pelo SNC causando uma hipoglicorraquia (BISSEL et al, 2016).

Quanto ao diagnóstico de doenças neurodegenerativas como a Doença de Alzheimer, os principais biomarcadores como placas cerebrais amiloides, emaranhados neurofibrilares intraneurais e a proteína Tau que, são considerados os principais compostos proteicos utilizados no diagnóstico da doença, podem ser encontrados no líquido cefalorraquidiano proporcionando uma via direta aos estudos de alterações bioquímicas do sistema nervoso central (TEUNISSEN; WILLEMSE, 2013). Com a deposição do peptídeo ab ocorre a formação de placas e agregados nos emaranhados fibrilares, axônios e dendritos causando neurites distróficas e o aumento da produção deste peptídeo é observado principalmente no LCR contribuindo no diagnóstico e prognóstico de pacientes com a patologia (FAGAN; HOLTZMAN, 2010).

### **1.3 Nanociência e Nanotecnologia**

Os termos nanociência e nanotecnologia surgiram a pouco menos de um século, quando os cientistas Arthur Von Hippel e Jack Kilby introduziram os primeiros relatos sobre a possibilidade de manipular a matéria em uma escala extremamente pequena a partir de átomos e moléculas, a qual foi chamada de engenharia molecular.

Alguns anos depois, em um encontro anual da Sociedade Americana de Física que aconteceu no ano de 1959, o cientista norte-americano Richard Feynman tornava-se mundialmente famoso após suas declarações a respeito da manipulação da matéria em escala atômica, pois ele acreditava que seria possível construir dispositivos muito pequenos constituídos de elementos ainda menores, dando origem a frase “There is plenty of room at the bottom” (há mais espaços lá

embaixo), pois ele acreditava ser possível escrever, por exemplo, a enciclopédia britânica na cabeça de um alfinete, porém o questionamento da época era como isso seria possível (TONET e LEONEL, 2019).

Finalmente, no ano de 1974, o pesquisador japonês Norio Taniguchi seria o responsável por inserir o conceito “nano” aplicado como prefixo a palavra tecnologia, neste período tornou-se possível a manipulação de materiais em escala nanométrica (DE SOUZA MARCONE, 2016). Entretanto, em 1986 o engenheiro norte-americano Eric Drexler publicara seu livro intitulado “Engines of creation: the coming era of nanotechnology” (Engenhos da criação: o advento da era da nanotecnologia) o qual disseminou o conhecimento sobre esta nova tecnologia atribuindo a este brilhante cientista a “paternidade” da nanotecnologia (SILVA et al, 2019).

A nanociência é o estudo e o conhecimento das técnicas e aplicações empregadas em todas as áreas da ciência envolvendo a nanotecnologia, sendo um campo científico bastante amplo (SCHMIDT, 2020). Atualmente existe um investimento do governo a respeito do desenvolvimento de diversas áreas da ciência, principalmente por parte dos países desenvolvidos, com o objetivo de proporcionar a inovação da tecnologia e a nanociência tem contribuído significativamente nesta questão. Desta forma, a nanociência é uma das áreas de maior interesse no mundo devido a sua capacidade de aprimorar áreas do conhecimento como a medicina, química, física, biologia, engenharia e a informática, contribuindo para o surgimento de inúmeras pesquisas e perspectivas no desenvolvimento novos materiais na indústria de forma geral (POLHMAN, 2019).

Devido ao fato de materiais em escala nanométrica apresentarem comportamento e propriedades diferentes dos materiais em dimensões maiores, cientistas, engenheiros e desenvolvedores tem mostrado bastante interesse na produção de nanomateriais (SCHMIDT, 2020). As propriedades geradas pelas leis que regem a mecânica quântica, a física e a química concedem aos nanomateriais características importantes como aumento da força, durabilidade, resistência, reatividade química, ductibilidade, entre outros. Por isso, muitos países desenvolvidos e subdesenvolvidos tem investido significativamente em nanociência e nanotecnologia pois estas representam grande potencial no avanço da inovação tecnológica e científica (FIALKOSKI; MALFATTI, 2019). Somado a isso, a Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD) juntamente com empresas de consultoria apontam que os investimentos em produtos gerados pela e nanotecnologia poderão render cerca de 3 trilhões de dólares em 2020,

baseado no ano de 2015 que teve como resultado 1 trilhão de dólares (HUPFFER, LAZZARETTI, 2019).

A nanotecnologia proporcionou grande avanço em diversas áreas da ciência nos últimos anos e na saúde principalmente quando aplicada a terapêutica e ao diagnóstico (SBALQUEIRO et al, 2018). Nanomedicamentos representam uma abordagem promissora em relação a melhora da ação sobre o tratamento e diagnóstico, principalmente quando aplicada ao câncer. Os medicamentos mais utilizados atualmente apresentam efeitos colaterais que são bastante incômodos aos pacientes e estes efeitos podem ser minimizados pela engenharia de medicamentos baseados em nanotecnologia. Porém, muitos trabalhos encontrados na literatura, mostram que nanomedicamentos apresentaram toxicidade celular, podendo causar ainda mais problemas aos pacientes em tratamento. Por isso, as agências reguladoras internacionais (FDA e EMA) e nacionais (Anvisa) tem trabalhado no sentido de esclarecer e criar métodos que possam avaliar os riscos que medicamentos produzidos por meios nanotecnológicos podem causar aos seres humanos (TOBLER; ROCHA, 2020).

No Brasil, as pesquisas envolvendo nanociência e nanotecnologia iniciaram muito além dos primeiros relatos sobre a manipulação da matéria em escala nanométrica, ocupando o 25º lugar em números de trabalhos desenvolvidos (DE SOUZA MARCONE, 2016). Mesmo com todo o potencial e relevância que esta temática oferece para o desenvolvimento da pesquisa científica e tecnológica, somente nos anos 2000 começaram a surgir os primeiros trabalhos e grupos de pesquisas na área “nano”. Em 2003 começaram a surgir os primeiros trabalho envolvendo políticas públicas com o objetivo de financiar pesquisas na área de nanotecnologia, como por exemplo, o *Programa Nacional para o Desenvolvimento da Ciência e da Tecnologia* criado pelo MCT (Ministério da Ciência e Tecnologia) o qual foi incorporado no plano plurianual do governo verbas destinadas a fomentar o desenvolvimento da nanotecnologia, tendo em vista a nova revolução industrial começada em países desenvolvidos representando o futuro da tecnologia e inovação. Após inúmeras reuniões para propor uma melhor forma de aplicar estes recursos e a inclusão da nanotecnologia como área estratégica, em 2012 foi criado a Iniciativa Brasileira de Nanotecnologia (IBN) pelo (MCTI) Ministério de Ciência, Tecnologia e Inovação, garantindo desta forma a aplicação de recursos para o desenvolvimento da nanotecnologia no Brasil (FIALKOSKI; MALFATTI, 2019).

### 1.3.1 Nanopartículas para a entrega de produtos naturais ao cérebro

Atualmente existem inúmeros estudos realizados a respeito desta ciência inovadora que consiste no controle e direcionamento de fármacos em escala nanométrica afim de potencializar a ação destes medicamentos no tratamento, diagnóstico, monitoramento e controle das mais diversas doenças que tem trazido preocupação à população mundial uma vez que inúmeras patologias ainda não apresentam terapias eficazes no tratamento das mesmas (WEN et al, 2017). Além de seu aprimoramento ao longo dos anos, a nanotecnologia tem encontrado aplicação em diversas áreas da ciência como o setor energético, médico, na engenharia, farmacêutico e etc. Os temas centrais abordados em cada um desses setores destacam-se o desenvolvimento de novos fármacos e medicamentos, matérias-primas e materiais inovadores e tradicionais incluindo a tecnologia de nanomateriais (SILVA ADAYA et al, 2017).

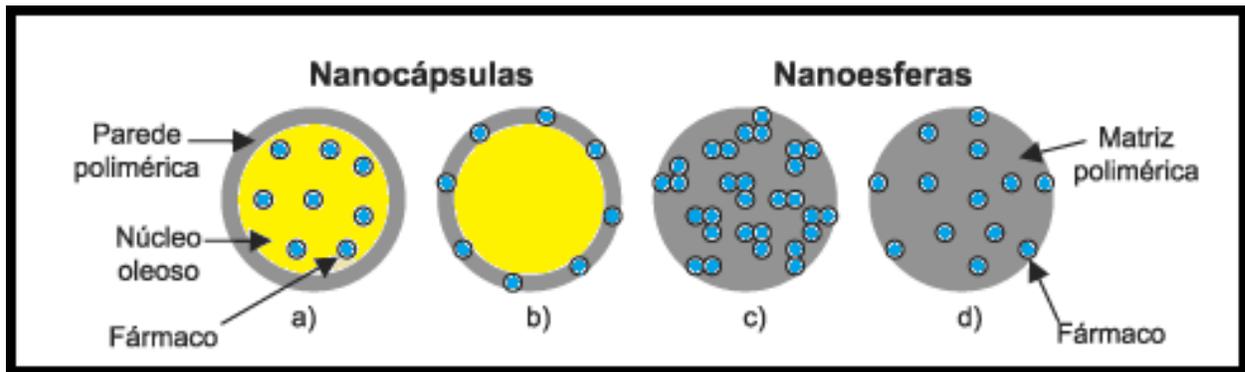
A *European Medicines Agency* define a nanotecnologia farmacêutica, na área da saúde, como uma ciência que utiliza nanossistemas (lipossomas, carreadores lipídicos nanoestruturados, nanopartículas lipídicas sólidas e nanopartículas poliméricas biodegradáveis) com dimensão de até 1000 nm projetados para apresentar propriedades específicas (MITRA; CONLEY; NAASH, 2016). Esses sistemas coloidais têm sido usados extensivamente na nanotecnologia pois podem armazenar em seu interior substâncias a serem direcionadas e carreadas a um sítio alvo (liberação controlada), solubilizar e manter o efeito do fármaco, e dessa forma aumenta sua estabilidade contra a degradação química e enzimática, encontrando ampla aplicação na indústria farmacêutica e na medicina (SAVALIYA et al, 2015).

A opsonização limita o uso desses sistemas coloidais (nanopartículas e lipossomas) quando usados para fins terapêuticos devido a interação de proteínas plasmáticas com a superfície desses nanossistemas sinalizando-as ao sistema fagocitário mononuclear (SFM) que promove uma rápida eliminação da corrente sanguínea. Portanto, pesquisas foram realizadas com o intuito de desenvolver novas técnicas para funcionalizar a superfície dos nanossistemas para impedir a adsorção das proteínas plasmáticas, evitando assim a opsonização e com isso prolongar o seu período na corrente sanguínea ou eliminar os riscos de sua depuração (MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010).

No geral, as nanopartículas poliméricas são nanossistemas constituídos de materiais formados por polímeros, geralmente biocompatíveis e biodegradáveis, cujas substâncias (fármacos

de origem natural ou medicamentos por exemplo) encapsuladas podem ser dissolvidas em seu núcleo oleoso, adsorvidas, conjugadas ou retidas em sua matriz polimérica de forma a serem carregados e liberados a um sítio alvo de forma controlada (SHAH; YADAV; AMIJI, 2013). As nanopartículas são divididas em nanocápsulas, que possuem um envoltório formado por polímeros lipossolúveis e nanoesferas que possuem uma estrutura matricial como mostra a figura 6 (SRIKANTH; KESSLER, 2012):

Figura 6 - a) fármaco dissolvido no núcleo oleoso das nanocápsulas; b) fármaco adsorvido à parede polimérica das nanocápsulas; c) fármaco retido na matriz polimérica das nanoesferas; d) fármaco adsorvido ou disperso molecularmente na matriz polimérica das nanoesferas.



Fonte: Couvreur e Vauthier (2006).

É um fato que o uso de nanopartículas na produção de novos fármacos tem despertado o interesse da indústria farmacêutica e da comunidade científica por apresentar inúmeras vantagens, como por exemplo, podem agir como vetores e controladores na liberação de substâncias sintéticas e naturais. Além disso, estes nanossistemas fornecem técnicas avançadas capazes de ultrapassar as barreiras cerebrais e realizar o transporte e entrega controlada de substâncias bioativas ao cérebro, sendo as principais (SHARMA et al, 2019):

- O tamanho das partículas e as características da superfície são facilmente manipuláveis a fim de fixar fármacos de forma passiva ou ativa após a administração parentérica bem como sua manutenção;
- Com o controle de liberação e entrega do fármaco carregado, os efeitos colaterais diminuem devido o transporte ao sítio alvo distribuindo o medicamento aos órgãos bem como sua depuração subsequente, aumentando sua eficácia terapêutica e prolongando sua ação;

- Compostos bioativos são facilmente incorporados aos nanossistemas sem a necessidade de algum tipo de reação química o que preserva sua atividade biológica e terapêutica não ocorrendo nenhum tipo de alteração e a degradação desses nanossistemas pode ser modulada de forma simples através da escolha dos constituintes da matriz;
- O direcionamento dos nanossistemas pode ser feito acoplando ligantes à sua superfície ou utilizando orientação magnética bem como sua fácil administração.
- Simplificação da posologia, podendo ser administrado em quantidades menores bem como pode utilizar outras vias de administração como: oral, nasal, parentérica, intra-ocular, etc.

Nanopartículas podem exibir um caráter hidrofílico ou lipofílico os quais podem ser produzidos seguindo as metodologias encontradas na literatura como: polimerização interfacial, polimerização em emulsão e polimerização por precipitação de polímero pré-formado (WACKERLIG; SCHIRHAGL, 2016). A opsonização, que é o reconhecimento e eliminação das nanopartículas através das proteínas plasmáticas do sistema fagocitário mononuclear, pois com a ligação rápida dessas proteínas a superfície dos nanossistemas o sistema fagocitário mononuclear (SFM) promove a fagocitose e as elimina da corrente sanguínea o que gera um problema a ser solucionado. Consequentemente, um grande número de estudos e técnicas tem sido desenvolvidas a fim de burlar o SFM promovendo o maior período ou até mesmo eliminar a adsorção das nanopartículas pelas proteínas plasmáticas na corrente sanguínea (FREITAS; GONCALVES; NOGUEIRA, 2014).

A nanotecnologia farmacêutica é uma das ciências que tem desenvolvido um grande número de pesquisas envolvendo técnicas para a otimização de novos medicamentos à base de produtos naturais utilizando sistemas coloidais como lipossomas, carreadores lipídicos nanoestruturados, nanopartículas poliméricas biodegradáveis, entre outros, que além de direcionarem o fármaco carreado a células e órgãos específicos do organismo possuem inúmeras vantagens que revolucionam o uso desses carreadores na liberação controlada de substâncias ativas tornando esta abordagem ainda mais atraente (STEICHEN; CALDORERA-MOORE; PEPPAS, 2013; KUO et al, 2017). Estudos envolvendo o emprego da nanotecnologia para a produção de fármacos de origem vegetal, utilizando extratos e óleos essenciais, tem sido amplamente divulgado na literatura uma vez que nanocarreadores podem potencializar a ação desses compostos naturais bem como promover uma liberação sustentada, bem como a diminuição de dosagens e efeitos colaterais (YU et al, 2016). Além disso, estudos utilizando modelos de nanocarreadores, como

nanopartículas poliméricas biodegradáveis e nanopartículas metálicas por exemplo, têm demonstrado grande eficiência em relação a permeabilidade da barreira hematoencefálica tornando viável a utilização desses nanossistemas para a entrega controlada de medicamentos ao sistema nervoso central (HOFF et al, 2013).

De acordo com os estudos de Ding e colaboradores (2020), muitas pesquisas envolvendo técnicas e abordagens não invasivas para burlar a barreira hematoencefálica tem se mostrado promissoras na entrega de agentes terapêuticos e macromoléculas ao cérebro. Com o advento da nanotecnologia, estas abordagens se tornaram ainda mais eficazes e representam um enorme potencial de aplicação. A produção de nanomateriais capazes de realizar a tarefa de transporte e liberação através da BHE só é possível devido por meio de suas propriedades como diâmetro na escala nano, alta capacidade de carregamento de drogas, estabilidade, produção facilitada, biodegradabilidade e biocompatibilidade. Segundo Mulvihill e colaboradores (2020) Para ser capaz de cruzar a BHE, nanocarreadores como nanopartículas poliméricas podem ser covalentemente ligados a agentes de direcionamento específicos cuja função serve para direcionar as NPs para locais específicos, como tumores ou agregados de proteínas.

### **1.3.2 Fatores que influenciam a passagem de nanopartículas através das barreiras cerebrais.**

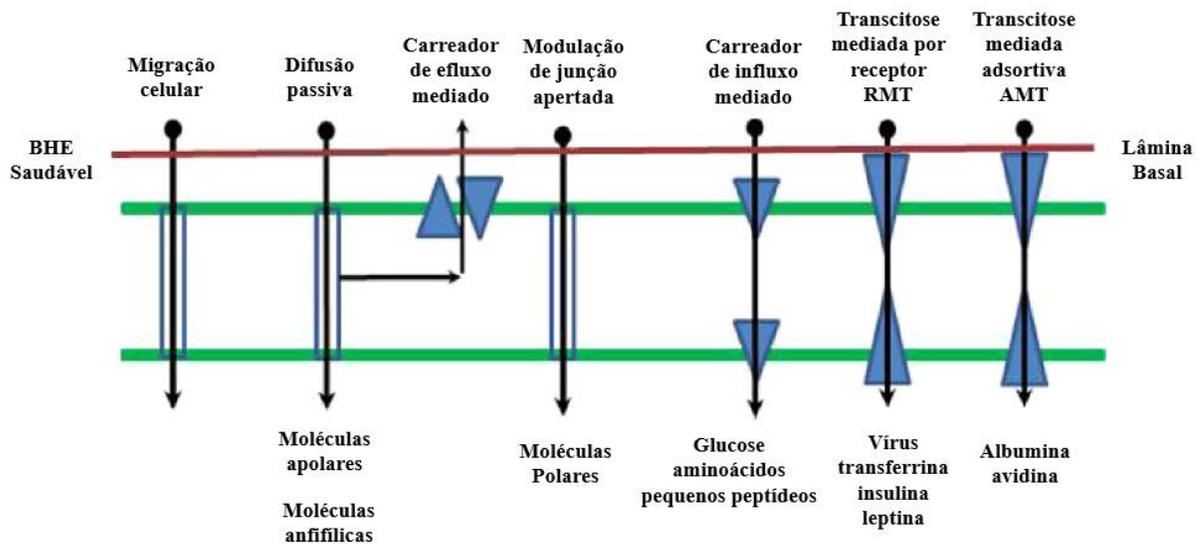
Como exposto, anteriormente, o sistema nervoso central é privilegiado por ser preservado por um eficiente sistema de proteção dinâmico anatômico e bioquímico cuja função é impedir e regular a passagem de macromoléculas e agentes nocivos através da circulação sanguínea que podem vir a deteriorar as células nervosas (SPUCH; SAIDA; NAVARRO, 2012).

As barreiras hematoencefálica e a sangue-líquido cefalorraquidiano fazem esse papel de isolamento do SNC do restante do organismo, a BHE controla a substâncias endógenas e exógenas presentes na corrente sanguínea e a BSLCR protege-o contra traumas e pressão que podem vir a acometer a massa encefálica, bem como macromoléculas e toxinas que são bloqueadas pelo líquido cefalorraquidiano (LCR) (PATTON et al, 2017). Este sistema de proteção do SNC se torna bastante eficiente também contra macromoléculas dos fármacos e medicamentos que são desenvolvidos e administrados no tratamento de desordens neurodegenerativas. Por essa razão, novas abordagens terapêuticas têm sido desenvolvidas baseadas em técnicas que possibilitem a entrega dessas

substâncias ao SNC por meio da livre passagem através dessas barreiras (STEICHEN; CALDORERA-MOORE; PEPPAS, 2013).

Existem alguns fatores que contribuem para a livre passagem através da barreira hematoencefálica, por exemplo, o uso adequado de transportadores existentes na anatomia da BHE podem proporcionar a entrega de moléculas e compostos endógenos e exógenos como mostra a Figura 7 (MARIANECCI et al, 2017).

Figura 7 - Rotas de transporte através da barreira hematoencefálica (BBB ou BHE). Nota: As linhas verdes indicam junções apertadas; as caixas azuis indicam transporte sem suporte ou mediado pelo receptor. Abreviaturas: RMT, transcitose mediada pelo receptor; AMT, transcitose mediada por adsorção



Fonte: adaptado de Marianecci et al (2017).

Devido a esta dificuldade imposta pelas barreiras cerebrais (BHE e BSLCR) estudo foram direcionados a trabalhar em escalas nanométricas cuja dimensão é observada em relação aos compostos regulados pela BHE e livre passagem até o parênquima cerebral, neste contexto, a nanotecnologia farmacêutica encontra uma oportunidade promissora no desenvolvimento de fármacos eficazes no tratamento de doenças neurológicas (CARRADORI et al, 2017).

### 1.3.3 Polímeros transponíveis às barreiras cerebrais

Compostos bioativos oriundos de produtos naturais de origem vegetal possuem características que, apesar de seus potenciais efeitos no tratamento de importantes doenças como

as desordens cerebrais, apresentam dificuldades principalmente na passagem pela BHE. Por isso, o uso de nanopartículas poliméricas biodegradáveis é uma alternativa promissora pois atravessam com facilidade barreira hematoencefálica, porém é extremamente importante conhecer as propriedades do polímero que será utilizado na produção do sistema tal qual se comporte da melhor maneira para entrega desses compostos de origem natural (HAN et al, 2012; FONSECA-SANTOS; GREMIAO; CHORILLI, 2015).

A modificação das superfícies das nanopartículas conjugando com ligantes covalentes para direcioná-las ou por revestimento com certos surfactantes que permitam a adsorção de proteínas plasmáticas específicas são necessárias, ou ainda, uma absorção mediada por um receptor, são extremamente importantes para a entrega de compostos ao SNC e quantidades suficientes atravessem a BHE (YUE et al, 2012). Em uma pesquisa realizada por Wohlfart e colaboradores Gelperina e Kreuter (2012) nanopartículas poliméricas biodegradáveis carregadas com doxorubicina cujos polímeros utilizados foram: poli (cianoacrilato de alquilo) e poli (lactido-co-glicolido) (PLGA), albumina de soro humano (HSA), assim como quitosana foram testados em ratos por meio de administração intravenosa no tratamento de glioblastoma experimental e os resultados obtidos sugerem que esta tecnologia é muito promissora para a terapia não-invasiva das doenças do SNC uma vez que modificar a superfície das nanopartículas utilizando substâncias químicas (síntese de pró-fármacos) ou bioquímicas (conjugação com anticorpos específicos) (GIACOMELLI; DANIELE; MARTINI, 2017) (LIU et al, 2017).

O PLGA é um polímero bastante utilizado na produção de nanocápsulas devido suas inúmeras vantagens tais como: biodegradabilidade, biocompatibilidade, aprovação pela FDA e Agência Europeia de Medicamentos em sistemas de administração de fármacos para administração parentérica, formulações e métodos de produção adaptados a vários tipos de fármacos, moléculas pequenas ou macromoléculas hidrofílicas ou hidrofóbicas, proteção do fármaco contra degradação, possibilidade de libertação prolongada, possibilidade de modificar propriedades de superfície para proporcionar melhor interação com materiais, possibilidade de direcionar as nanopartículas para órgãos ou células específicos (DANHIER et al, 2012; RAFIEI; HADDADI, 2017).

Além das propriedades atrativas do PLGA sua ação biodegradável ocorre com a sua hidrólise que leva a formação de monómeros metabólitos, ácido láctico e ácido glicólico (NOORI KOOPAEI et al, 2014). Entretanto a hidrofobicidade do PLGA é uma propriedade não favorável quando se trata da barreira hematoencefálica pois dificulta a entrega de compostos e a

administração parenteral que levou ao desenvolvimento de copolímeros que possuem a capacidade de carrear moléculas hidrofílicas para serem entregues ao sistema nervoso central e viabilizar a passagem pela BHE (WIN-SHWE; FUJIMAKI, 2011). Além disso, funcionalizar a superfície das nanopartículas pode ajudar a adsorção das células endoteliais e assim os compostos serem entregues ao SNC constituindo assim mais uma alternativa de transpor os limites da BHE (ZHANG; XU; LIU, 2015; WEN et al, 2016).

Além dos surfactantes que solubilizam os lipídios das membranas celulares, outra estratégia nanotecnológica é o revestimento das nanopartículas com polietileno glicol (PEG) e anticorpos que melhoram a adsorção e a permeabilidade das junções apertadas que forma as células endoteliais da BHE (SARAF, 2009; GOMES; NEVES; SARMENTO, 2014).

Pesquisas encontradas na literatura sobre a produção de nanopartículas de poli (n-butil cianoacrilato) revestidas com polissorbato 80 e carregadas com tacrina e rivastigmina e o seu uso na entrega desses compostos ao cérebro para a tratamento da doença de Alzheimer obtiveram resultados promissores, a concentração de tacrina no cérebro foi de 170 ng/mL sendo este valor significativamente maior quando comparado aos resultados obtidos utilizando nanopartículas não revestidas ou do fármaco livre (WILSON et al, 2008b). Vários autores sugerem que a interação do polissorbato 80 com as células endoteliais dos microvasos cerebrais permitem a passagem de compostos através da BHE e este mecanismo de libertação de compostos medicamentosos ao cérebro se torna uma alternativa promissora na produção de fármacos de origem natural (SUN et al, 2005; WILSON et al, 2008a).

Os copolímeros biodegradáveis de monometoxi(polietilenoglicol)-poli(ácido lático-co-ácido glicólico)-monometoxil(polietilenoglicol) (PELGE) proporcionam mais uma alternativa na entrega de fármacos naturais e sintéticos ao SNC pois prolongam o período das nanopartículas na circulação sanguínea, além disso a superfície modificada com PEG (poli-etilenoglicol) ajuda a proteger o fármaco encapsulado da interação com os componentes sanguíneos podendo assim as nanopartículas de PELGE serem uma alternativa terapêutica a serem administradas intravenosamente (GUNASEKARAN et al, 2014). Em um estudo realizado por Duam et al (2005), nanopartículas de PELGE contendo mitoxantrona (DHAQ), um potente agente anticancerígeno, foram produzidos e testados em ratinhos cujos resultados mostram a presença das nanopartículas por um maior período de tempo na circulação sanguínea levando a uma maior interação com as células tumorais levando-as à destruição e diminuindo a toxicidade do DHAQ (DUAN et al, 2004).

Han et al (2012) desenvolveu nanopartículas de PELGE para carrear quatro compostos presentes no extrato da planta *Ginkgo biloba* (ginkgolóides A, B e C e bilobolida), compostos considerados potentes agentes antioxidantes e neuroprotetores, e entregar ao sistema nervoso central cuja liberação prolongada e sincronizada foi observado em teste *in vitro e in vivo*, e ainda as nanopartículas de PELGE melhoraram o tempo de meia vida dos compostos na corrente sanguínea e diminuíram a degradação do PLGA sugerindo desta forma que as nanopartículas de PELGE são promissores carreadores de produtos naturais contendo variados tipos de substâncias (HAN et al, 2012).

As nanopartículas produzidas com o polímero PLA tendo sua superfície modificada utilizando surfactantes ou anticorpos são ótimas candidatas à entrega de medicamentos aos SNC do que as nanopartículas de PLA sem algum tipo de ligante conjugado bem como o uso livre de fármacos não carreados uma vez que a modificação da superfície da nanopartícula é extremamente importante para ultrapassar a barreira hematoencefálica (KUMAR et al, 2010). LIANG e ZHU (2013) relataram que em suas pesquisas realizadas na produção de nanocápsulas de PLA que tiveram sua superfície modificada com polissorbato 80 aumentaram suas concentrações no cérebro significativamente do que as produzidas sem surfactante e os testes tanto *in vitro* quanto *em vivo* comprovaram sua eficácia (LIANG; ZHU, 2011).

#### **1.3.4 Tipos de sistemas propostos e mecanismos de internalização**

A nanotecnologia além de melhorar as terapias convencionais empregadas no tratamento de doença, também tem como objetivo desenvolver novos sistemas nanométricos com propriedades específicas afim de otimizar a eficácia de fármacos padrões bem como produzir novos fármacos de origem natural com potenciais atividades biológicas promissoras capazes de superar as limitações dos medicamentos já existentes na indústria farmacêutica (CARRADORI et al, 2017). Nesse contexto, a nanomedicina, que é a aplicação médica da nanotecnologia, tem alcançado resultados pré-clínicos bem-sucedidos na abordagem de nanossistemas carreadores de fármacos eficientes na entrega de compostos à sítios alvos específicos, fato que contribui para a evolução de inovadoras terapias naturais envolvendo nanossistemas (SPUCH; SAIDA; NAVARRO, 2012).

A produção nanossistemas contendo agentes bioativos naturais apresentam características relevantes como atingir o sítio alvo sem perdas significativas de sua atividade,

tamanho do composto, atividade superficial e toxicidade do transportador (GANESAN et al, 2015). Para obter essas características é importante escolher a metodologia adequada para a administração em distúrbios neurodegenerativos, por exemplo, o método de liberação adequado e eficiente deve estar livre de efeitos colaterais, deve-se observar as propriedades físico-químicas do local de destino, os revestimentos hidrófilos devem ser capazes de resistir a fagocitose, bem como devem ser biodegradáveis e não tóxicos (CHENG et al, 2015; GANESAN et al, 2015). A barreira hematoencefálica representa um dos principais fatores que levam a produção de nanopartículas funcionalizadas para realizar a livre passagem e entregar o composto ao sistema nervoso central para que o mesmo desempenhe suas funções biológicas e aja de acordo com a natureza histopatológica da doença neurodegenerativa bem como aumentar a sua biodisponibilidade e diminuir a toxicidade sendo este um processo contínuo na investigação farmacêutica (MISRA et al, 2003). Para isso, a nanotecnologia dispõe de várias metodologias para desenvolver sistemas nanoparticulados com objetivos específicos de acordo com o mecanismo de determinada patologia (MODI; PILLAY; CHOONARA, 2010).

Para evitar a degradação de compostos fito-bioativos como a curcumina e o reverastrol, compostos extraídos da Açafraão-da-Índia (*Cúrcuma longa*) e sementes de uva (*Vitis vinifera*), respectivamente, a metodologia escolhida para a produção de nanopartículas. Esses compostos fito-bioativos possuem grande potencial antioxidante porém quando administrados via oral possuem baixa biodisponibilidade para chegar ao cérebro, neste contexto a produção de nanocápsulas com curcumina e reverastrol dissolvida em seu núcleo oleoso ou adsorvido e suas paredes juntamente com agentes de proteção adequados aumenta a biodisponibilidade do composto para o cérebro bem como nanopartículas revestidas de tiamina, fator que potencializa a entrega da curcumina ao cérebro ajudando na redução do estresse oxidativo causado pelas doenças neurodegenerativas (KAKKAR et al, 2013).

A apolipoproteína E possui isoformas ApoE2, ApoE3 e ApoE4 que formam complexos com o peptídeo A $\beta$  cuja agregação e deposição formam das placas senis e novos neurofibrilares em células nervosas (JAROONWITCHAWAN et al, 2017). A ApoE2 e ApoE3 impedem o acúmulo e o transporte da A $\beta$  através da BHE caracterizando uma atividade neuroprotetora enquanto a ApoE4 promove a junção da A $\beta$  no cérebro. Neste contexto, Nanocápsulas poliméricas biodegradáveis contendo curcumina foram desenvolvidas ligando à sua superfície ApoE3 que além de promover a passagem através da BHE também proporciona uma terapia anti-A $\beta$  diminuindo o

estresse oxidativo e impedindo a evolução de doenças degenerativas cerebrais como Stroke, Alzheimer e Parkinson (MULIK et al, 2010). KAKKAR et al (2013) desenvolveu nanopartículas lipídicas sólidas contendo curcumina obtendo resultados satisfatórios na funcionalização desses nanossistemas com polissorbato hidrofílico 80 no revestimento exterior que são seletivamente tomadas pelos receptores APO E presentes na BHE e o tratamento com C-SLNs restabeleceu as temperaturas corporais normais e um aumento significativo de BW indicando proteção contra danos induzidos pelo AVC isquêmico.

Recentes estudos sobre a timoquinona, um composto derivado da *Nigella sativa*, tem demonstrado potencial biológico frente a doenças anti-inflamatórias, anticancerígenas e também as causadas por estresse oxidativo e neurodegenerativas (RAVINDRAN et al, 2010; AHMAD et al, 2016). Para aumentar a biodisponibilidade desse composto e a sua passagem pela BHE Alam et al (2012) produziu nanocápsulas poliméricas mucoadesivas de quitosana contendo timoquinona para serem administradas via nasal e entrega do composto ao cérebro em ratos Wistar e foi observado que a metodologia empregada foi bastante eficaz sugerindo uma promissora abordagem de sistemas carreadores na entrega de produtos naturais ao sistema nervoso central e tratamento da doença de Alzheimer. Em um estudo realizado utilizando um modelo *in vivo* mostrou que a timoquinona administrada por via intraperitoneal foi eficaz na redução do estresse oxidativo e lesão histopatológica em modelo de rato de isquemia/reperfusão aguda da aorta abdominal (ABU-DAHAB et al, 2013; AYDIN et al, 2015).

A planta de origem chinesa Ginkgo (*Ginkgo biloba L.*) cuja existência ocorre desde os tempos dos dinossauros, é uma erva extensivamente usada e o extrato de suas folhas contém uma composição química composta de terpenóides (mistura de ginkgolides) e bilobolida cuja atividade biológica Antagonista do receptor do fator ativador de plaquetas (PAF), Vasorregulação, prevenção de danos à membrana Por radicais livres, efeito neuroprotetor e ainda são capazes de tratar a isquemia cerebral (HAN et al, 2012). Devido o curto tempo de vida desses princípios ativos na circulação sanguínea, novas dosagens se tornam necessárias. Na pesquisa realizada por HAN et al (2012) foi produzido um sistema nanoparticulado carregado com terpenos de ginkgo e formulado com PELGE (copolímeros biodegradáveis de monometoxi (polietilenoglicol)-poli (lactide-co-glicólido)-monometoxil (poli-etilenoglicol) para que alcancem co-encapsulação, liberação sustentada e sincronizada dos múltiplos componentes de terpenos de ginkgo pois essas nanopartículas através da administração intravenosa em ratinhos resultou em seu tempo prolongado

de circulação no sangue comparado à administração intravenosa de nanopartículas de PLGA (LIAO et al, 2014).

### 1.5 Transportadores ABC

Os capilares cerebrais são formados por uma fina camada de células endoteliais cujas junções apertadas constituem a parte física da barreira hematoencefálica fazendo o controle e isolamento do sistema nervoso central de efluxos de substâncias neurotóxicas, livre circulação de drogas, xenobióticos, peptídeos endógenos e outros compostos circulantes presentes na corrente sanguínea (ROMERMANN et al, 2017). As células endoteliais são revestidas e polarizadas por uma membrana apical voltada para o sangue (membrana luminal) e uma membrana basolateral voltada para o tecido cerebral (membrana abluminal) onde estão presentes proteínas de transporte e receptores que modulam o movimento de solutos através do BHE (QOSA et al, 2015). Dentre estas proteínas estão os transportadores de cassete de ligação ATP (ABC) que pertencem a uma superfamília de proteínas que foram classificados pela Organização do Genoma Humano em 7 famílias, nomeados de ABC-A para ABC-G. O transportador ABC mais proeminente e melhor estudado é o produto gênico 1 p-glicoproteína (P-GP) de resistência a múltiplos fármacos (MDR1, ABCB1, P-GP). Estes transportadores reconhecem uma ampla gama de diferentes substratos, xenobióticos e metabolitos e os transportam de volta para a circulação sanguínea bombeando-os através do lado luminal das células endoteliais dos capilares cerebrais (MAHRINGER; FRICKER, 2016). Portanto, esta característica vem sendo bastante explorada por pesquisadores no intuito de desenvolver mecanismos de transporte e entrega de fármacos ao SNC utilizando estas proteínas como meio de transporte através da BHE (MILLER, 2015).

A P-gp pode ser o transportador ABC mais importante no SNC que desempenha um papel crucial tanto na neuroproteção como na farmacorresistência cuja contribuição proporciona um amplo espectro de substrato passíveis de serem transportados. Segundo Miller (2015), alguns hormônios, fosfolípidos, citocinas e prostaglandinas devem ser efetuados, embora haja menos dados disponíveis para substratos endógenos específicos, por exemplo, vários fosfolípidos, esfingolípidos, aldosterona e amilóide-p (subproduto neuronal) são substratos de P-gp; Glutathione (GSH), leucotrienos conjugados com GSH e prostaglandinas, conjugados de glucoronido e sulfato são substratos de MRP1; Estrones e ácidos biliares são substratos BCRP (SHAROM, 2008). Além

do endógeno moléculas, os transportadores de efluxo ABC manipulam agentes terapêuticos estruturalmente diversos que variam de moléculas de fármacos pequenas tais como morfina (285 Da) a fármacos de grande porte tais como Ciclosporina-A (1200 Da).

Nanopartículas oferecem inúmeras vantagens como um sistema de liberação de fármaco nanoparticulado capaz de melhorar a eficácia do fármaco e/ou enriquecer o sistema com propriedades suplementares tais como características de direcionamento um fator importante na produção de novos fármacos uma vez controle fisiológico da BHE precisa ser superado (KANWAR; SRIRAMOJU; KANWAR, 2012). Segundo Marianecchi et al, (2017), uma abordagem não-invasiva promissora para transporte e entrega de biomateriais ao cérebro envolvendo a nanomedicina seria o desenvolvimento biomateriais, em tamanho nanoescala, capazes de elevar os níveis cerebrais de substâncias medicamentosas incapazes de atravessar a BHE sendo estes: cérebro, tais como nanopartículas poliméricas, dendrímeros, transportadores vesiculares, metal e silício.

Na literatura existem pesquisas variadas a respeito de fármacos encapsulados que foram produzidos com diversos polímeros, como ácido láctico-co-glicólico (PLGA), que apresentaram ótimos resultados se tratando da livre passagem através da BHE bem como vários sistemas e mecanismos desenvolvidos para vencer essas barreiras constituindo um importante grupo de medicamentos de origem natural no tratamento de doenças cuja etiologia deriva do estresse oxidativo (SUN et al, 2016).

Um motivo que pode justificar a passagem de nanopartículas através da BHE seria o aumento da concentração nas paredes das células endoteliais dos capilares cerebrais associado a pressão exercida pela corrente sanguínea proporcionando a adsorção das nanopartículas aos capilares cerebrais (VEDAGIRI; THANGARAJAN, 2016). Outro fator importante seria a modificação da superfície das nanocápsulas conjugando o surfactante polissorbato 80 cujos estudos encontrados na literatura tem demonstrado ser uma excelente estratégia na entrega de fármacos carregados por nanopartículas ao sistema nervoso central fazendo com que a BHE deixe de ser um empecilho na produção de fármacos envolvendo nanossistemas carregadores de compostos originários de plantas medicinais (SONI; KOHLI; JAIN, 2005; GAO; JIANG, 2006; MARCIANES et al, 2017).

## 1.5 Plantas medicinais

O uso de plantas medicinais com a finalidade de tratar de doenças é um fato constatado ao longo da história da população mundial, cujos relatos datam mais de 5 mil anos (MARMITT et al, 2018). Atualmente existem inúmeras doenças cuja etiologia ainda é desconhecida, fato que impulsiona o desenvolvimento de pesquisas científicas com o intuito de descobrir novos fármacos que possam ser capazes de tratar e até mesmo curar estas enfermidades, contribuindo diretamente para a evolução da Indústria Farmacêutica (ASSIS et al, 2015).

Uma planta é classificada como medicinal quando ela produz alguma substância que possui atividade biológica capaz de agir contra algum mecanismo envolvido no desenvolvimento de determinada enfermidade (SALESSE et al, 2018). Estas substâncias são chamadas de princípios ativos e representam uma fonte inesgotável de novas substâncias que, a partir do século XIX, a comunidade científica começou a estudá-las e extraí-las, desvendando seus mecanismos de ação e produzindo suas próprias versões, dando início a transição entre o uso de plantas medicinais e os medicamentos sintéticos (BARBOSA, et al, 2017).

Devido ao baixo poder aquisitivo da população que vive em países subdesenvolvidos, as plantas medicinais representam uma alternativa financeira (SALESSE et al, 2018). Por isso, o tratamento fitoterápico que alcança diversos tipos de enfermidades, continua sendo uma prática etnobotânica bastante difundida, o que não exclui uma parte das pessoas que vivem em países desenvolvidos e que sofrem com a desigualdade social. De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), 80% da população mundial recorre a medicina tradicional como forma de aliviar os sintomas dolorosos e indesejáveis causados por algum tipo de patologia e devido a este fato pode-se gerar um lucro de aproximadamente 22 milhões de dólares impulsionando a economia global (FIRMO et al, 2011). Além disso, o fato da prática fitoterápica poder proporcionar uma fonte de renda para muitos países, principalmente aqueles cuja biodiversidade é bastante ampla, podendo contribuir diretamente para o desenvolvimento do setor médico privado de forma a gerar renda e tornando-se mais acessível para pacientes cujos recursos financeiros são escassos (PEREIRA et al, 2016).

O Brasil é um país que possui uma extensão territorial de dimensões continentais, abrangendo uma área de 8,5 milhões km<sup>2</sup> que é mais da metade da América do Sul (TESTA; DE ROSA; FAVERO, 2020). Por essa razão, há uma grande variedade de biomas e ecossistemas no

território brasileiro e, conseqüentemente, reflete em grandes números de fauna e flora, dando origem a maior biodiversidade do mundo, representando mais de 20% da vida animal e vegetal existentes no planeta, deixando o Brasil entre os 17 países mais mega diversos (DA MOTA JUNIOR et al, 2019). Decerto, esta diversidade e regiões distintas que abrigam variados ecossistemas abrangem áreas únicas que por sua vez dão origem a várias espécies endêmicas. É imprescindível que haja um maior aproveitamento da biodiversidade brasileira por meio de estudos científicos para que se possa garantir de forma segura o acesso aos seus recursos genéticos exóticos ao quais são essenciais ao melhoramento da agricultura, da pecuária, da silvicultura e da piscicultura (FILOCREÃO et al, 2015).

A biodiversidade pode dar origem a produtos e processos que podem alavancar a economia local, por exemplo, 31% das exportações brasileiras advém do extrativismo vegetal (SANTOS et al, 2019). A biomassa vegetal produz o café, a soja e a laranja que correspondem aos produtos mais exportados no país, bem como a cana de açúcar, o carvão e a lenha que são responsáveis pela geração de 30% da matriz energética. Além disso, boa parte da população brasileira faz uso do conhecimento etnobotânico adquirido ao longo da vida como parte da herança das gerações passadas para tratar seus problemas de saúde, e muitas vezes impulsionada pela falta de recurso e acesso aos medicamentos alopáticos (CASTRO; FIGUEIREDO, 2019).

A biodiversidade vegetal brasileira possui mais de 50 mil espécies catalogadas, porém há muitas espécies que ainda não foram descobertas e, portanto, estudadas (BARROS; GARCIA; ANDREOTTI, 2019). Apenas 1% da fauna brasileira foi estudada química e farmacologicamente, sendo que cerca de 300 amostras vegetais consideradas medicinais foram agregadas a lista de exemplares utilizados pela população brasileira e regulamentada pela Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (PNPMF) (FIGUEIREDO et al, 2014; SALESSE et al, 2018). Somente na Amazônia cerca de cinco mil das vinte e cinco mil espécies conhecidas e catalogadas foram estudadas e suas propriedades terapêuticas comprovadas por meio da pesquisa científica. Estas ervas medicinais exibem praticamente todos os tipos de ações biologicamente ativas como: antitumorais, anti-inflamatórias, antiespasmódicas, antimicrobianas, fungicidas, ansiolíticas, diuréticas, neuroprotetoras, antivirais, inseticidas, entre outras, e estas propriedades proporcionam o incentivo a pesquisa e desenvolvimento de novos fitoterápicos e fármacos de origem natural que sejam capazes de tratar e curar variadas afecções, principalmente as que possuem sua etiologia desconhecida (BARROS et al, 2019).

Dentre as principais doenças que não possuem cura estão as desordens cerebrais causadas pela perda progressiva e irreversível das células nervosas, responsáveis pelo funcionamento do sistema nervoso central (STEPHENSON et al, 2018). Devido a isso, os neurônios perdem a capacidade de produzir os neurotransmissores os quais são substâncias importantes para o funcionamento do metabolismo cerebral, dando origem a uma série de patologias que causam complicações físicas e psíquicas ao indivíduo. O número de diagnósticos tem aumentado exponencialmente em todo o mundo devido ao aumento da expectativa de vida da população de países desenvolvidos e em desenvolvimento, porém há outros fatores apontados como precursores dessas doenças (DAWSON et al, 2018). De acordo com Bondy (2016), pode-se constatar que a poluição antropogênica está ligada diretamente ao surgimento de doenças neurodegenerativas, pois agentes xenobióticos podem acelerar o envelhecimento do sistema nervoso central. Além disso, o estresse oxidativo causado pelas espécies reativas de oxigênio presentes no cérebro, sedentarismo e obesidade podem acelerar a neurosenescência contribuindo para o surgimento de desordens cerebrais (HERRERA et al, 2018; MAZON et al 2017).

O grande problema envolvendo o tratamento de doenças neurodegenerativas é a existência de barreiras cerebrais cuja função é o controle de substâncias advindas da corrente sanguínea que eventualmente poderiam causar dano ao sistema nervoso (SHARMA et al, 2019). Devido a este controle gerenciado pelas barreiras hematoencefálica e líquido-sangue cefalorraquidiano, a passagem de substâncias biologicamente ativas para as células nervosas é dificultada. Neste cenário, a nanotecnologia dispõe de técnicas capazes de produzir nanossistemas transportadores de substâncias ativas até um sítio específico, realizando a entrega e liberação controlada representado para a indústria farmacêutica uma alternativa para o tratamento de inúmeras patologias inclusive desordens cerebrais (GONDIM et al, 2019). Além disso, o uso destes sistemas é decorrente, principalmente, do pequeno tamanho que favorece a adsorção sobre as paredes dos capilares na barreira hematoencefálica (BHE), culminando com um gradiente de efluxo com abertura das junções apertadas e transcitose através do endotélio (KOLA et al, 2019; MAY et al, 2020). Estes nanocarreadores oferecem vantagens como potencializar o efeito inibitório em relação a enzima acetilcolinesterase por meio da eficiência da liberação controlada de fármaco às células nervosas, oferecem a proteção do fármaco em relação a degradação enzimática e química e podem sofrer modificações em sua superfície de forma a serem vetorizados a regiões específicas do corpo, por exemplo, a passagem através da BHE (KARAMI; ZANJANI; HAMIDI, 2019).

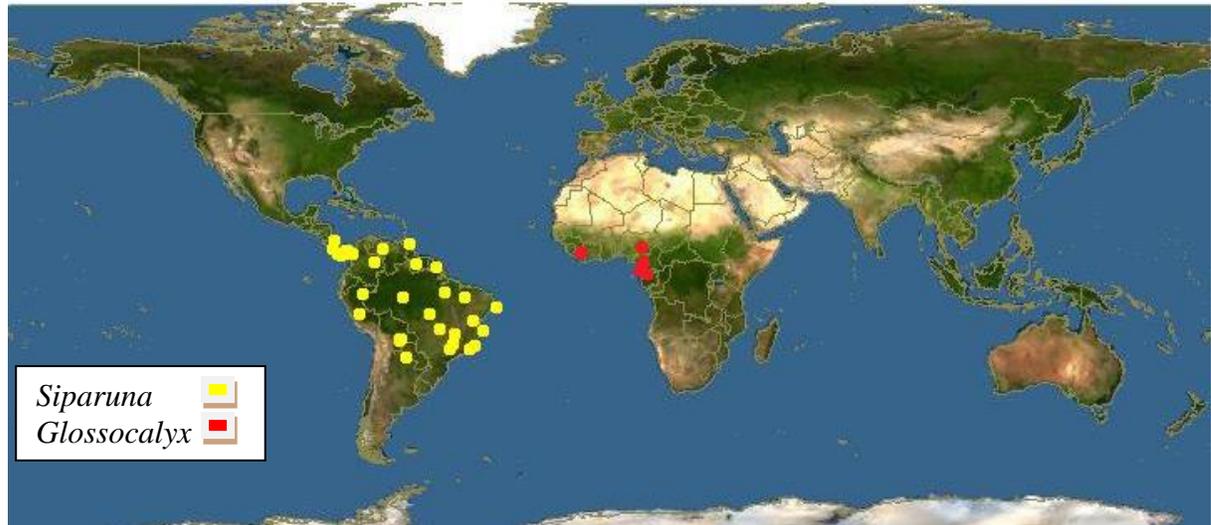
Em geral, medicamentos produzidos à base de produtos naturais possuem boa atividade biológica cuja propriedade medicinal tem sido atribuída a pequenos terpenóides e compostos fenólicos como timol, carvona, carvacrol, mentol e muuroleno, que também na forma pura exibem atividade antibacteriana ou antifúngica (TEIXEIRA et al, 2014). Apesar dos mecanismos de ação estar incipientemente caracterizados, provavelmente a atividade terapêutica está associado ao caráter lipofílico dos compostos (GECHEV et al, 2014). As diferenças com respeito às técnicas empregadas para investigação da ação de compostos de plantas e uma grande variação encontrada na composição química de algumas preparações vegetais, podem resultar em dados de difícil comparação entre as pesquisas (ZHANG et al, 2012).

### **1.6 *Siparuna guianensis* Aubl.**

A planta *Siparuna guianensis* Aubl. pertence à família Siparunaceae, cujas espécies que fazem parte desta família ocorrem em dois continentes distintos: a América (região sul e latina) e África (MOURA et al, 2020). Os gêneros que compõem esta família são *Siparuna* Aubl. e *Glossocalyx* Benth. (Figura 8). O gênero *Siparuna* Aubl. é nativo da América Latina e possui cerca de 65 espécies distribuídas nos neotrópicos, sendo que exemplares deste grupo podem ocorrer desde a Nicarágua até o Paraguai e várias regiões do Brasil. Já o gênero *Glossocalyx* Benth. é monoespecífico e pode ser encontrada no oeste da África ocidental (HALL; MEIRELLES, 2017).

De acordo com um estudo realizado por Jussieu em 1809, pode-se constatar que o gênero *Siparuna* foi erroneamente atribuído a subdivisão da família Monimiaceae, onde denominou-se o termo em alusão ao gênero *Monímia* (FREIRE, 1943). Além disso, Fischer (1997) também correlacionou o gênero *Siparuna* a família Monimiaceae Jussieu, porém pesquisas atuais mostram o gênero *Siparuna* pertence de fato à família Siparunaceae, o qual foi classificado desta forma pela filogenética AGP III (2009) a qual é um sistema de taxionomia vegetal moderna utilizada para classificar plantas produzem flores (THE ANGIOSPERM PHYLOGENY GROUP, 2009).

Figura 8 – Ocorrência das espécies do gênero *Siparuna* Aubl. e *Glossocalyx* Benth.



Fonte: Martins (2016).

Segundo a Lista de Espécies da Flora do Brasil 2020, o gênero *Siparuna* Aubl. é neotropical e possui cerca de 60 espécies, sendo sua distribuição nos seguintes países: México, pela América Central, Antilhas e América do Sul até o sul do Brasil e Paraguai, principalmente na diversidade na Amazônia. No Brasil são encontradas 20 espécies, inclusive a espécie *Siparuna guianensis* Aubl. As regiões do Brasil em que podem ser encontradas exemplares deste gênero são: Nordeste (Alagoas, Bahia, Ceará, Maranhão, Paraíba, Pernambuco, Piauí, e Rio Grande do Norte), no Centro Oeste (Distrito Federal, Goiás, Mato Grosso e Mato Grosso do Sul), no Sudeste (Espírito Santo, Minas Gerais, Rio de Janeiro e São Paulo), e no Sul (Paraná). As plantas do gênero *Siparuna* são facilmente encontradas nas bordas das florestas.

Uma importante espécie destacada da família Siparunaceae é a *Siparuna guianensis* Aubl. devido a sua incidência em todo território brasileiro e a sua fenologia marcante, motivo pelo qual há uma grande variação no rendimento e composição química do óleo essencial por ela produzido, podendo apresentar substâncias distintas em cada região onde é encontrada bem como sua importância prioritária na conservação do cerrado brasileiro e o encorajamento de mais pesquisas sobre esta espécie para o enriquecimento sobre seu conhecimento, pois é apontada pelos estudiosos como espécie genética de preservação do cerrado mato-grossense (ALMEIDA et al, 2021).

A espécie *Siparuna guianensis* Aubl. é conhecida popularmente como capituiú, negramina, folha santa, limão-bravo, jaqueira e catingueira-de-paca (AGUIAR et al, 2015). foi a primeira

espécie do gênero *Siparuna* Aubl. a ser catalogada por Aubl. na *Histoire des plantes de La Guiane Française* (1775). Suas principais características botânicas são: cascas esverdeadas que quando envelhecem se tornam acinzentadas, odor aromático, com râmulos jovens rufo-pubescentes, folhas simples, alongadas, elípticas, membranáceas, de margens lisas, com flores unissexuais, e frutos elipsoides deiscetes verdes quando jovens e cor de vinho quando maduros, estes frutos quando abrem expõem um interior róseo-avermelhado com sementes afixadas mostradas as quais são responsáveis pela sua reprodução. A Figura 9 mostra um exemplar encontrado na região do município do Cantá pertencente ao estado de Roraima.

Figura 9 – Arbusto da planta *Siparuna guianensis* Aubl. encontrada na região do Cantá-RR



Fonte: Martins (2016).

As aplicações fitoterápicas desta espécie medicinal são bastante abrangentes, sendo apontada por estudiosos como uma espécie prioritária de conservação (VALENTINI et al, 2010). As folhas desta planta são utilizadas em banho para dores no corpo e para curar a malina a qual é descrita como um tipo de dor de cabeça causada pela exposição demasiada ao sol que provoca corrimento de sangue nasal (ANDRADE et al, 2015). Além disso, existem relatos encontrados na literatura sobre as indicações de raizeiros, que recomendam o uso da folha na forma de decocto e infuso para enxaquecas, resfriado, banho de descarrego para mau olhado, assim como para hipertermia e hemoptise. Por fim, as folhas são utilizadas na forma de chá e banhos para fraqueza, febre, repelentes nos galinheiros para piolho de galinha, e por fim também são utilizados rituais espirituais (FERREIRA et al, 2019).

## 1.7 Óleos essenciais

Os óleos essenciais (OE) constituem um dos grupos de matérias primas economicamente importantes para as indústrias de alimentos, farmacêutica e cosmética (BARROS et al, 2018). São caracterizados por possuírem odor intenso e são extremamente voláteis, geralmente produzidos por diversas partes de plantas aromáticas, por exemplo, folhas, frutos, flores, cascas e até mesmo nas raízes (BARROS; GARCIA; ANDREOTTI, 2019). Os OE são geralmente extraídos por meio de hidrodestilação e sua composição química é constituída de várias classes de substâncias, produzidas pelo metabolismo secundário das plantas em função de sua interação com o meio ambiente, possuindo funções de comunicação e defesa, com a finalidade de garantir sua sobrevivência. O Brasil possui grande biodiversidade, com uma flora bastante abundante que proporciona alta produção de OEs de diversas espécies, por exemplo, andiroba, cajá, copaíba, cupuaçu e pau-rosa, entre outros, sendo amplamente utilizados pela medicina tradicional (FELIPE; BICAS, 2017; NEGRINI et al, 2019).

Óleos essenciais fazem parte dos produtos naturais de origem vegetal e são ricos em compostos bioativos, possuem vantagens interessantes, como por exemplo, alta eficiência, vários modos de ação, baixa toxicidade para organismos não-alvo e uso potencial como subprodutos (BARROS et al, 2018). A mistura complexa que forma os OE são substâncias de baixo peso molecular, geralmente classificados como terpenos e fenilpropanóides e, quando há a presença de oxigênios em sua cadeia, os terpenos são denominados de terpenóides e podem pertencer a diversos grupos orgânicos como álcoois, fenóis, aldeídos, hidrocarbonetos, cetonas, éteres, lactonas, entre outros (BARBOSA et al, 2019). Além disso, a composição química dos OEs pode apresentar de vinte a sessenta substâncias, das quais uma pequena quantidade (20 - 70%) são denominadas como compostos majoritários (CARDOSO et al, 2020).

Os terpenos também são conhecidos como isoprenóides devido ao fato de suas estruturas moleculares serem formadas por resíduos de cadeias de isopreno (AL-NAGAR et al, 2019). Os terpenos são classificados de acordo com a quantidade de unidades isoprênicas em sua estrutura (metil – buta-1-3-dieno, com cinco átomos de carbono e oito átomos de hidrogênio), sendo que a união de cada unidade ocorre acordo com a regra “cabeça-cauda” conforme mostra a Tabela 1. Conforme suas rotas biossintéticas, as unidades isoprênicas também podem dar origem aos chamados isoprenos irregulares cujas cadeias carbônicas se ligam de forma diferente, como por

exemplo o  $\beta$ -caroteno que se liga “cauda a cauda”, desta forma, estas ligações geram outras estruturas que originam terpenos de cadeia aberta e terpenos de cadeia fechada (NOVAES, 2019).

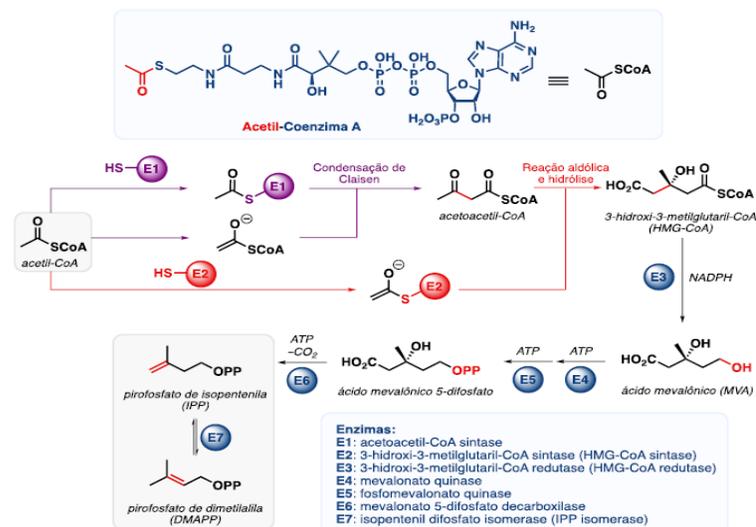
Tabela 1 – Classificação de terpenos quanto ao número de isoprenos

Número de Carbonos	Unidades Isoprênicas	Classificação
10	2	Monoterpeno
15	3	Sesquiterpeno
20	4	Diterpeno
25	5	Sesterterpeno
30	6	Triterpeno
40	8	Tetraterpeno

Fonte: Bergamaschi (2016).

Estes compostos pertencem a uma grande classe de compostos orgânicos que são naturalmente produzidos por vegetais aromáticos por meio de duas rotas biossintéticas que utilizam unidades isoprenóides básicas: o pirofosfato de isopentenila (IPP) e o pirofosfato de dimetilalila (DMAPP) cuja formação ocorre por meio das vias do mevalonato e do metileritritol fosfato (MEP). Na rota do mevalonato, por exemplo, as unidades isoprenóides se formam por meio de acetil-coenzima A, iniciando a reação com três unidades de acetil-coenzima A (AcSCoA), como mostra a Figura 10 (FELIPE e BICAS, 2017).

Figura 10 – Representação esquemática da rota do mevalonato



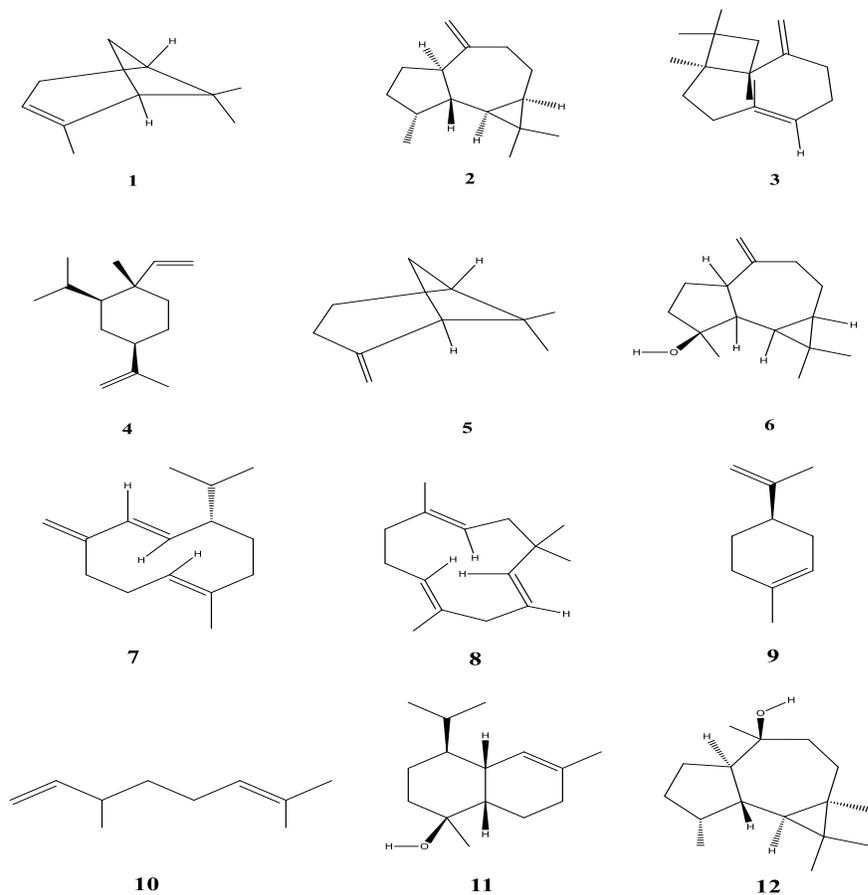
Fonte: Adaptado de Novaes (2019).

A formação de acetoacetil-coenzima A ocorre por meio de duas moléculas de AcSCoA que são utilizadas na *via* uma condensação de Claisen e em seguida há uma reação aldólica com uma terceira molécula de AcSCoA e uma hidrólise, formando a 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA (HMG-CoA). Desta forma, o tioéster é reduzido até o álcool primário (ácido mevalônico), sofrendo duas fosforilações sequenciais. Por fim, a enzima mevalonato 5-difosfato decarboxilase proporciona a decarboxilação e desidratação para fornecer o pirofosfato de isopentenila (IPP), e sua forma isomerizada pirofosfato de dimetilalila (DMAPP) (NOVAES, 2019).

Muitas ervas e plantas superiores tem sido usadas ao longo dos anos como fonte natural para a extração de óleos essenciais e conseqüentemente de terpenóides para serem usados como fragrâncias e dar sabores aos alimentos (DE REZENDE et al, 2016). Atualmente são conhecidos mais de vinte e dois mil tipos de terpenos encontrados em OE, tornando-os um grupo importante e expressivo de produtos naturais que exibem diversos tipos de atividade biológica, prevenindo e tratando diversas doenças. Além disso, muitos estudos encontrados na literatura mostram que alguns terpenos tem exibido atividade antitumoral, anti-inflamatório, anticolinesterásica, entre outros, representando ótimas perspectivas para o setor farmacêutico (CARVALHO et al, 2018).

Há mais de 1.000 monoterpênos, mais de 7.000 sesquiterpênos e mais de 3.000 diterpênos e muitos deles podem ser comercialmente encontrados sob sua forma isolada (BORGES; AMORIM, 2020). Porém, o uso de óleos essenciais ainda é bastante difundido e os terpenos mais comumente caracterizados são:  $\beta$ -cariofileno, encontrado no OE da copaíba; o limoneno,  $\beta$ -pineno e  $\gamma$ -terpineno, encontrados no OE do limão e da casca da laranja; o zingibereno, AR-curcumeno,  $\beta$ -sesquifelandreno, e o bisaboleno extraídos do gengibre; o  $\alpha$ -humuleno, cariofileno, eugenol, encontrados no cravo, e muitos outros. Diversos estudos científicos encontrados na literatura foram realizados para comprovar a atividade biológica, mostrando que os terpenos são produtos naturais de grande potencial terapêutico. Na figura 11 estão sumarizados os principais terpenóides recorrentes na composição química dos óleos essenciais em geral (SILVA et al, 2018).

Figura 11 - Principais terpenóides recorrentes na composição química dos óleos essenciais



Legenda: 1-  $\alpha$ -pineno, 2- Aromadendreno, 3 -  $\beta$ - cariofileno, 4 -  $\beta$ - elemeno, 5 -  $\beta$ -pineno, 6 - Epatulenol, Germacreno-D, 7 - Humuleno, 8 - Limoneno, 9 - Mirceno, 10 - T- muurolool, 11 - Viridiflorol.

As vias metabólicas secundárias vegetais dão origem a diversas classes de compostos, tais como, alcalóides, flavonóides, isoflavonóides, taninos, cumarinas, glicosídeos terpenóides e poliacetilenos, que por vezes, são específicos de determinadas famílias, gêneros ou espécies, cujas funções, até pouco tempo eram desconhecidas. A maioria desses metabólitos foram isolados (cerca de doze mil) e essa quantidade ainda parece ser inferiores a 10% do total. Algumas substâncias fornecem odor para a planta, outros (quinonas e taninos) são responsáveis pelo pigmento e muitos compostos são responsáveis pelo sabor da planta (NOVAES, 2019). Os compostos de origem vegetal demonstram uma grande importância na medicina moderna, pois entre 1984 e 1994, dos medicamentos aprovados pelo Ministério da Saúde, 6% foram extraídos diretamente de espécies vegetais, 24% foram produzidos a partir de produtos derivados de vegetais e 9% foram desenvolvidos através da modelagem molecular de estruturas químicas de compostos vegetais que

serviram como protótipos, sendo que, atualmente metade dos 25 medicamentos de maior utilização no mundo foi originada de metabólitos secundários de plantas medicinais (DE ALMEIDA, et al, 2020).

### **1.8 Estudos de interação entre o óleo essencial e a AChE**

Como foi discutido anteriormente, a doença de Alzheimer é uma desordem neurodegenerativa que afeta indivíduos acima de 65 anos de idade, causando a perda da capacidade cognitiva, comunicativa e da memória (DOURLEN et al, 2019). Como a causa do surgimento da DA é desconhecida, os pesquisadores trabalham com hipóteses que podem ajudar a entender como a doença surge e se desenvolve, por exemplo, a hipótese colinérgica consiste na diminuição da produção do neurotransmissor acetilcolina, responsável pelo estabelecimento das sinapses entre os neurônios, sendo que este composto tem um tempo de meia vida curto pois é facilmente hidrolisado pela enzima acetilcolinesterase quando este é liberado pelas vesículas sinápticas e entra na sinapse. Por isso, o principal tipo de terapia aplicada em pacientes diagnosticados com a DA consiste no uso de inibidores da enzima acetilcolinesterase para o reestabelecimento da atividade estimuladora da acetilcolina nas sinapses bem como o aumento de seu tempo de meia vida (ÖZDEMİR; ÖZÇELİK; UYSAL, 2019).

Os produtos naturais, em especial as plantas medicinais, representam uma alternativa terapêutica para o tratamento da DA pois são uma fonte natural de novas substâncias ativas (WANG; HE; SHI, 2020). Plantas medicinais e aromáticas também fornecem óleos essenciais que devido a sua composição rica em compostos ativos, podem ser utilizados como inibidores da AChE e assim tratar a DA de forma natural. Vários estudos encontrados na literatura mostram que os óleos essenciais são potenciais inibidores da AChE, como por exemplo, as espécies de *Narcissus poeticus* L., *Melaleuca*, *Acorus calamus* L., *Eucalyptus camaldulensis* Dehnh., *Marlierea racemosa* Kiaersk., *Cymbopogon schoenanthus* Spreng., e variados óleos da família Lamiaceae.

Os óleos essenciais são capazes de tratar sistemas biológicos, pois em sua composição há inúmeros compostos que exibem algum tipo de ação contra diversos patógenos, podendo ainda agirem em sinergismo tornando-os ainda mais potentes (VAN DE VEL; SAMPERS; RAES, 2019). Constata-se que a atividade psicotrópica dos óleos essenciais tem sido utilizada na medicina tradicional desde os tempos mais antigos. Seus efeitos mentais têm a capacidade de atuar sobre a

cognição e aspectos emocionais, por esta razão, foram introduzidos na terapêutica para diversos fins, inclusive em rituais espirituais e outros não tão especiais. Desta forma, foram desenvolvidos vários estudos sobre o uso de produtos naturais atuando como neurotransmissores sendo os principais ativos produzidos por produtos naturais, por exemplo alcaloides e terpenos, sendo estes os principais constituintes dos óleos essenciais (GANDHI et al, 2019).

Diversos estudos encontrados na literatura mostram a atividade antiacetilcolinesterásica de compostos encontrados em óleos essenciais, com potencial aplicabilidade terapêutica (KARAKAYA, et al 2019). Por exemplo, os monoterpenos neral, geranial e linalol; os sesquiterpenos óxido de cariofileno e tumerona e o eugenol que é classificado como um fenilpropanóide. Em um trabalho realizado por por Fujiwara e colaboradores (2010), foram avaliadas as composições químicas e a atividade inibidora da acetilcolinesterase (AChE) do óleo volátil da casca de *Peltophorum dasyrachis* Kurz ex Bakar (batai amarelo), mostrando que a estrutura desses compostos inibidores influencia em sua atividade inibitória além do teste de atividade contra a AChE ter sido considerado potencialmente inibitório, com valor de IC<sub>50</sub> de 83,2 (2,8 µg / mL). Al-Nagar e colaboradores (2019) avaliaram a atividade de onze monoterpenos, fenilpropenos e sesquiterpenos, onde (-) - carvona, cuminaldeído e (Z, E) -nerolidol apresentaram efeitos inibitórios significativos da AChE, sendo que o cuminaldeído e (Z, E) -nerolidol apresentaram IC<sub>50</sub> de 1,04 mM e 0,02 mM. Cardoso e colaboradores testaram a atividade dos terpenos timol e o carvacrol que inibiram a AChE a apresentaram IC<sub>50</sub> de 0,93 e 0,04 mg mL<sup>-1</sup>, respectivamente. Além destes, o IC<sub>50</sub> exibida por eucaliptol, carvacrol e timol para AChE foi de 0,36, 0,28 e 0,13 mg mL<sup>-1</sup>, respectivamente.

A ação neuroprotetora dos óleos essenciais obtidos por meio extração de plantas aromáticas são bastante promissoras, pois são constituídos de uma série de substâncias ativas capazes de atuarem como inibidores da AChE. Por exemplo, YADAV e colaboradores (2019) elaboraram um review sistemático sobre a atividade biológica da espécie de *Acorus calamus* L. e constataram que se extrato causou 53,7 +/- 5,5% de inibição da enzima acetilcolinesterase. Segundo Almeida et al (2017) o óleo essencial extraído das flores da planta *hyptis dilatata* tanto no período seco quanto chuvoso, submetidos a ensaios *in vitro* de inibição da AChE e foram capazes de inibir a potencialmente a enzima. No trabalho realizado por Medeiros et al (2016) o óleo essencial da planta *Bauhinia unguolata* L. inibited 95,96%±0,62 a AChE, sendo considerada um agente anticolinesterásico. Por fim, Lopés e colaboradores (2019) realizaram um estudo para elucidar o

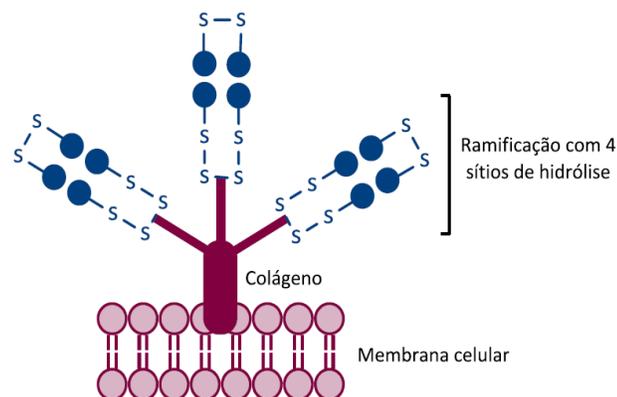
mecanismo de ação da atividade do óleo essencial de *Origanum syriacum* contra o mosquito vector *Culex quinquefasciatus* e o parasita gastrointestinal *Anisakis simplex* por meio de ensaios de inibição da AChE chegando a conclusão que além de matar as larvas do mosquito, o óleo essencial consegue inibir a enzima mesmo em concentrações baixas podendo estar ligada diretamente com o mecanismo de ação do óleo essencial contra as larvas e parasitas vetorizados pelo mosquito.

### 1.9 Supressão de Fluorescência

Para a realização de estudos que possam melhorar a compreensão de como compostos encontrados em óleos essenciais podem exercer sobre a enzima acetilcolinesterase, pode-se fazer uso de técnicas sensíveis a parâmetros físico-químicos e características estruturais da enzima. Decerto, a AChE contém aminoácidos aromáticos presentes em sua estrutura molecular que podem sofrer modificações devido a presença de moléculas inibidoras. Desta forma, dentre os métodos que satisfazem estes requisitos, encontra-se a titulação em supressão de fluorescência cuja capacidade pode ajudar a elucidar como ocorre a interação entre enzimas e compostos inibidores (BARROS et al, 2019).

A AChE é uma enzima composta por três ramificações sendo estas formadas por pontes dissulfetos que ligam as quatro subunidades proteicas que são capazes de hidrolisar a ACh (ELDUFANI; BLAISE, 2019). Desta forma, a AChE ligada a membrana celular por um colágeno, possui 12 sítios ativos somando todas as subunidades proteicas em cada unidade enzimática (ramificação) como mostra a Figura 12.

Figura 12 - Representação dos sítios de ligação da enzima acetilcolinesterase

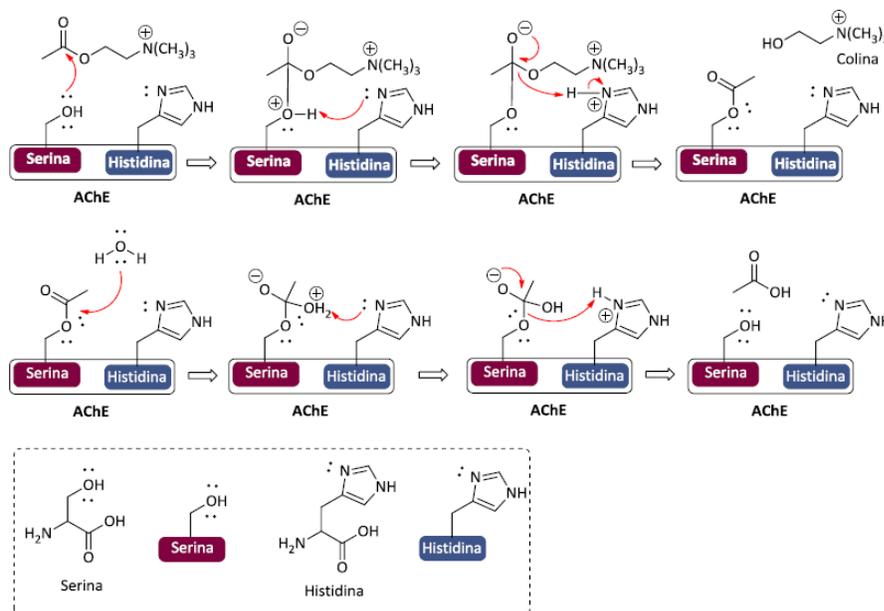


Fonte: Adaptado de Araújo et al (2012).

A histidina e a serina são aminoácidos que forma as subunidades catalíticas da AChE proporcionando sua atividade e capacidade de hidrolisar a ACh. A reação ocorre primeiramente devido ao grupo iônico formado pelo nitrogênio da ACh que interage com o resíduo de aspartato da AChE que fornece um par de elétrons agindo como uma base. O segundo fator para a reação é interação com o grupo carbonila éster da ACh (sítio esteárico) com a serina (resíduo de tirosina), formando uma ponte de hidrogênio. A histidina funciona como um catalizador ácido base e a serina como um agente doador de um par de elétrons (nucleófilo) e a reação de hidrólise da ACh só funciona com a presença de ambas (ARAÚJO et al, 2012).

Após a ACh ser liberada pelas vesículas sinápticas e entrar na sinapse, a carbonila do neurotransmissor é atacada pela AChE por meio de um par de elétrons da hidroxila do resíduo de serina (WAISKOPF; SOREQ, 2015). Logo em seguida a histidina retira um próton do íon hidroxônio formado e posteriormente doa este mesmo próton para a porção colina da ACh, sendo liberada como produto. Desta forma, a porção colina deixa a AChE acetilada e para que este processo seja reversível, a enzima deverá sofrer hidrólise por meio da água agindo como nucleófilo. Por fim, o ácido acético formado neste processo juntamente com o resíduo de serina são liberados, tornando a enzima ativa mais uma vez conforme podemos ver na Figura 13.

Figura 13 – Representação esquemática da hidrólise da acetilcolina pela enzima acetilcolinesterase



Fonte: adaptado de Araújo et al (2012).

O fenômeno da luminescência consiste na emissão de luz por determinada substância, ocorrendo por meio de estados eletrônicos excitados (SAMOKHVALOV, 2020). Este estado da natureza pode ser classificado de acordo com a natureza da absorção e emissão de energia. Por exemplo, a fluorescência ocorre quando a emissão de luz é a partir de um estado excitado singlete, onde esta emissão possui um tempo de vida na ordem de  $10^{-9}$  s. Já a fosforescência ocorre quando a emissão de luz é a partir de um estado excitado tripleto, possuindo um tempo de vida compreendido entre  $10^{-3}$  a  $10^0$  s. Muitas substâncias são capazes de absorver energia onde os elétrons presentes em suas estruturas saltam de uma camada para outra e quando retornam de seu estado excitado liberam a mesma quantidade de energia na forma de fótons sendo chamadas de fluoróforos (WANG; ZENG; LI, 2017).

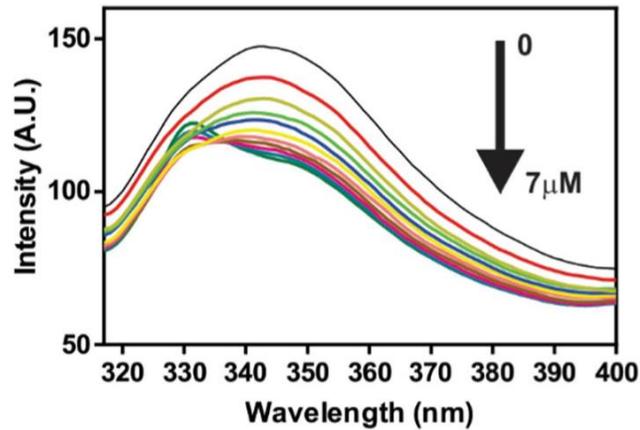
Compostos orgânicos são capazes de agirem como fluoróforos, emitindo energia em uma determinada intensidade de fluorescência sendo que esta propriedade ocorre comumente em estruturas aromáticas. Entretanto, esta mesma intensidade pode ser diminuída de diversas formas, principalmente quando ocorre a difusão entre um fluoróforo e um supressor (*quencher*) durante o tempo de vida de um estado excitado. Portanto, quando ocorre a diminuição da intensidade de fluorescência causada pela interação entre uma molécula e um agente supressor, este fenômeno é denominado de supressão de fluorescência (*quenching*) (WANG et al, 2017).

Quando há o decaimento da emissão de energia de um fluoróforo em decorrência da presença de um agente supressor, utiliza-se a equação de Stern-Volmer (GEHLEN, 2020):

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_q \tau_0 [Q] = 1 + K_D [Q]$$

Na equação,  $F_0$  e  $F$  representam a intensidade de fluorescência na ausência e presença do supressor, respectivamente.  $K_q$  é a constante bimolecular de supressão e  $\tau_0$  é o tempo de vida do fluoróforo na ausência do supressor.  $K_D$  determina a constante de supressão de Stern-Volmer,  $[Q]$  a concentração do supressor e  $K_q$  é igual a constante de supressão bimolecular que determina a interação entre fluoróforos e supressores bem como a eficiência da supressão de fluorescência. Quando for constatada a supressão de fluorescência os dados obtidos são representados por meio de um gráfico da razão entre as intensidades de fluorescência ( $F_0/F$ ) versus a concentração do supressor  $[Q]$  Figura 14 (GEHLEN, 2020; LAKOWICZ, 2013).

Figura 14 - Gráfico de supressão de fluorescência



Fonte: adaptado de Menezes et al (2019).

Muitos compostos orgânicos, como proteínas por exemplo, podem assumir o papel de supressores, tornando possível, por meio da supressão de fluorescência, a investigação sobre a interação entre compostos bioativos e enzimas, como no caso da AChE, a fim de descobrir novos agentes anticolinesterásicos. Entretanto é necessário realizar um estudo minucioso sobre qual o comportamento da interação entre o fluoróforo e o supressor (MENEZES et al, 2019). Por exemplo, quando há uma mudança na linearidade de Stern-Volmer não pode-se afirmar que houve de fato uma supressão, da mesma forma, se houver a colisão entre moléculas e grupos de fluoróforos sendo que uma delas está acessível ao supressor, observa-se que o gráfico de Stern-Volmer sofre um desvio de linearidade e deve-se fazer uma nova avaliação. Portanto, se a supressão for colisional (dinâmica) considera-se que a diminuição na intensidade de fluorescência é igual ao tempo de vida do fluoróforo representada pela seguinte equação:

$$\frac{\tau_0}{\tau} = 1 + K_q \tau_0 [Q]$$

Desta forma:

$$\frac{F_0}{F} = \frac{\tau_0}{\tau}$$

Este fato ocorre devido a população de fluoróforos no estado excitado diminuir sua energia de excitação por conta da colisão. Porém, a supressão estática não provoca o decréscimo do tempo

de vida, pois as moléculas fluorescentes continuam sendo observadas e os fluoróforos que não forma complexos exibem o mesmo tempo de vida  $\tau_0$ . A formação de um complexo não fluorescente entre um grupo fluorescente e um supressor também pode gerar o fenômeno da supressão pois o complexo formado pode absorver luz e voltar ao seu estado fundamental, porém sem a emissão de um fóton descrevendo a supressão estática que é descrita pela equação:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_s[Q]$$

A expressão revela que  $\frac{F_0}{F}$  é linear representando os mesmos valores para a supressão dinâmica, porém a diferença é a partir deste entendimento,  $K_s$  representa a própria constante de associação. Há outros fatores que ajudam a diferenciar a supressão estática e a dinâmica como a dependência distinta em função da temperatura, viscosidade e medidas de tempo de vida (HUANG et al, 2019; TADINI; MOUNIER; MILORI, 2020).

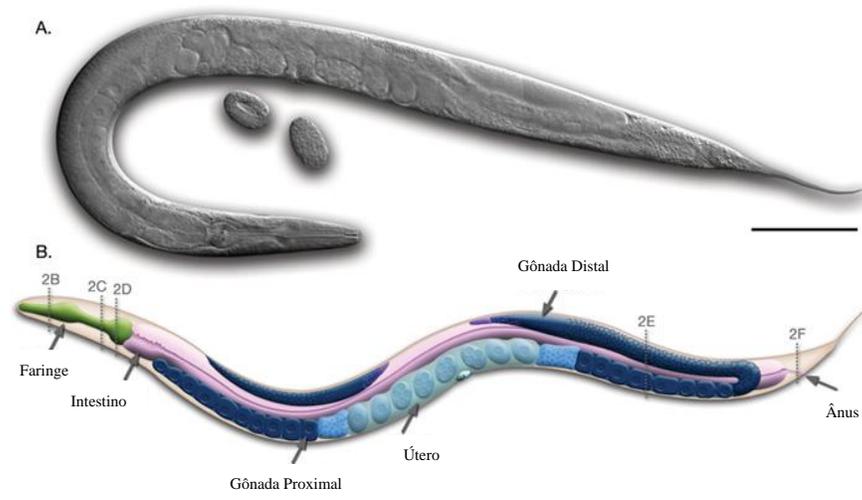
### 1.10 *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*)

O desenvolvimento científico possibilitou o surgimento de substâncias oriundas de produtos naturais que podem ser utilizadas no controle ou tratamento de doenças bem como a produção e caracterização de novas moléculas com potencial terapêutico (PAOLO et al, 2019). Os produtos obtidos de fontes naturais têm sido usados no tratamento de diferentes doenças como fonte de agentes medicinais por diferentes gerações e em diferentes civilizações na história da humanidade (RHEMAN et al, 2019). Diferentes moléculas de diversas espécies vegetais foram caracterizadas ao longo do tempo e avaliadas quanto ao potencial neuroprotetor, tendo em vista a ineficácia e inespecificidade de algumas drogas frente a gama de diferentes doenças neurológicas e neurodegenerativas (BHAT et al, 2017).

O animal de nome científico *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) é um nematódeo não patogênico proposto em 1963 pelo pesquisador sul-africano Sydney Brenner (Figura 15). Ele expôs o animal a comunidade científica como novo modelo experimental tendo seu genoma inteiramente sequenciado e possuindo 60 à 80% de homologia com os genes humanos (WOOD, 1985; CONSORTIUM, 1998; KALETTA et al, 2006). Medindo 1 mm no estágio larval de adulto é encontrado no solo em diversos países do mundo e em laboratório, usado em estudos toxicológicos,

farmacológicos, genéticos, entre outros (DONALD, 1997). Esses vermes possuem grande capacidade reprodutiva, quando hermafrodita gera entre 200 e 300 descendentes e o processo de cruzamento com vermes machos (0,02% da população) aumenta a prole gerando em torno de 1,000 novos descendentes (NAYAK et al, 2004).

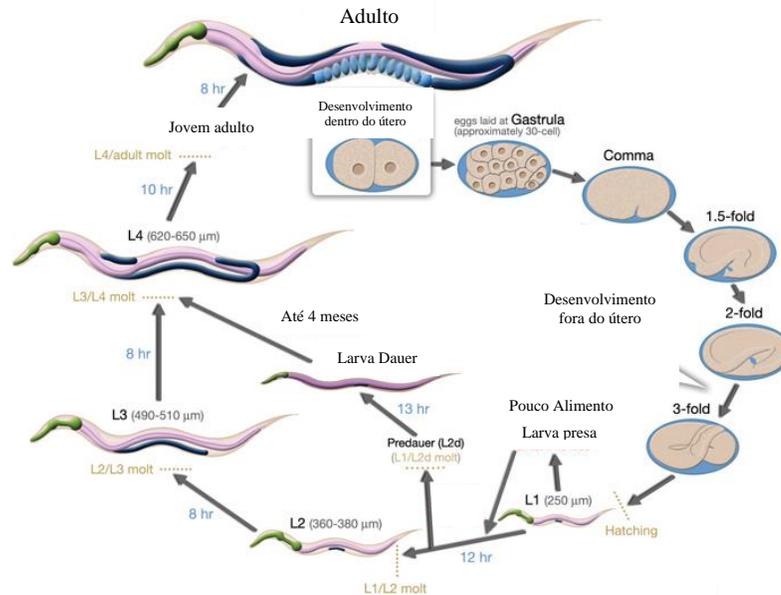
Figura 15 - Anatomia de um hermafrodita adulto



Fonte: Adaptado de <http://www.wormbook.org/>.

O ciclo de vida dos animais é de aproximadamente 21 dias sendo um período curto de amadurecimento (L1, L2, L3, L4 e adultos) até a vida adulta (48 horas após eclosão dos ovos) (Wormatlas) (Figura 16). Esta característica possibilita o desenvolvimento de diversos estudos e modelos de doenças neurodegenerativas tornando o *C. elegans* uma ótima ferramenta para examinar as bases moleculares dessas patologias. Doenças neurodegenerativas como a doença de Alzheimer, mal de Parkinson, doença de Huntington, esclerose múltipla possuem em comum o distúrbio de conformação de proteínas neurotóxicas e o *C. elegans* proporciona o estudo dos mecanismos envolvidos em cada uma destas patologias. Além disso, estes modelos podem ser utilizados para a investigação e triagem de novas substâncias que podem ser capazes de tratar estas doenças cuja etiologia é desconhecida e/ou não há tratamento eficaz (CALDWELL; WILLICOTT; CALDWELL, 2020; VAN PELT; TRUTTMANN, 2020).

Figura 16 - Ciclo de vida do *C. elegans* a 22 °C.



Fonte: Adaptado de <http://www.wormbook.org/>.

A doença de Alzheimer (DA) é a principal causa de demência em todo mundo, com caráter debilitante causando deterioração cognitiva, perda de memória, dificuldade de aprendizado, agressividade, mudanças de humor, entre outras (SCHELTENS, et al, 2021; LEI et al, 2021). A expressão do peptídeo  $\beta$ -amilóide ( $A\beta$ ) é característica da DA em conjunto a formas hiperfosforiladas e clivadas da proteína TAU humana, a clivagem alterada da proteína precursora do amilóide (APP) por  $\beta$ -secretases (BACE1) e  $\gamma$ -secretases causam produção de fibrilas  $A\beta$  insolúveis. O acúmulo de proteínas anormalmente dobradas por oligomerização do peptídeo  $A\beta$  causa danos ao processo de comunicação sináptica pela difusão dos peptídeos  $A\beta$  nas fendas sinápticas (CREWS et al, 2010; TIWARI, et al, 2019). É comum na DA o comprometimento do tecido cerebral levando a atrofia das regiões de acúmulo de placas  $A\beta$ , aumentando a produção de espécies reativas de oxigênio que causam a deterioração progressiva do sistema nervoso (ZHANG; LIN; WU, 2021; TONNIES et al, 2017).

A tecnologia de transgenia dominada pela humanidade nos últimos anos, bem como o domínio das técnicas de biologia molecular como o desenvolvimento e aplicação de CRISPR-Cas9 tornou real a possibilidade de produção de animais transgênicos e humanizados expressando os mais diferentes tipos de proteínas humanas em distintos modelos experimentais (SHROCK;

GÜELL, 2017). Animais transgênicos de *C. elegans* foram desenvolvidos com a capacidade de expressar proteínas A $\beta$  em neurônios e músculos, apresentando comportamentos característicos da DA como perda de memória e disfunções locomotoras na perspectiva de facilitar o desenvolvimento de novas drogas capazes de reverter o perfil metabólico, toxicológico e agregativo característicos da doença, dentre essas a avaliação de produtos naturais com potencial terapêutico (WAM et al, 2021; ZHANG et al, 2016; ZHU et al, 2017). Chen e colaboradores (2020) analisaram a atividade biológica do óleo essencial de *Acorus tatarinowii* Schott (SCP-OIL) em um modelo de Alzheimer que avalia a diminuição do acúmulo de A $\beta$  em *C. elegans*. A figura 17 mostra que SCP-OIL foi capaz de reduzir significativamente a deposição de proteínas A $\beta$  e melhorar a sensibilidade à serotonina e a habilidade de aprendizado olfativo em vermes. Além disso, o mecanismo de ação farmacológica do SCP-Oil mostrou que a manutenção da homeostase proteica é dependente da via de autofagia regulada em parte pelos genes hsf-1 e sir-2.1. Por tanto, o SCP-OIL reduziu os danos causados pela agregação da proteína da A $\beta$  que é responsável pelo desenvolvimento/evolução do Alzheimer.

Figura 17 - A proteção do SCP-Oil contra danos induzidos por A $\beta$



Fonte: Chen e colaboradores (2020).

A descoberta de novas biomoléculas com o potencial de tratar e/ou diminuir a sintomatologia da doença é crucial no estadiamento de bioprodutos vegetais. Estudos envolvendo óleos essenciais apontam resultados positivos com o tratamento de modelos para a doença de Alzheimer em *C. elegans* (ZHU et al, 2017; CHEN et al, 2020; YEN et al, 2016). Diminuição de agregados proteicos, regulação dos fenótipos comportamentais, diminuição do status de paralisia e déficits na memória são vistos em animais transgênicos que expressam o peptídeo A $\beta$  tratados com óleos essenciais. O papel dos óleos essenciais como tratamento frente a fisiopatologia da doença dá-se por inúmeros processos bioquímicos e moleculares, gerando a diminuição do conteúdo oxidativo, agregativo dos peptídeos A $\beta$  e toxicológico induzido por tal agregação (YEN et al, 2016; MANALO et al, 2017).

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

O objetivo deste trabalho foi realizar a prospecção das propriedades farmacobotânicas do óleo essencial in natura e nanoencapsulado de *Siparuna guianensis* Aubl. em modelo experimental para Doença de Alzheimer.

### 2.2 Objetivos Específicos

- ❖ Realizar a extração do óleo essencial das folhas frescas da espécie vegetal *Siparuna guianensis* Aubl.;
- ❖ Caracterizar a composição química do OESG;
- ❖ Determinar Valores de IC<sub>20</sub> e IC<sub>50</sub> do OESG relacionados a inibição da AChE de três tipos de organismos aquáticos (molusco, crustáceo e peixe).
- ❖ Elucidar o mecanismo de inibição do OESG por meio do modelo cinético de Michaelis-Menten;
- ❖ Analisar a interação entre os compostos químicos presentes no OESG e a AChE por meio dos métodos de supressão de fluorescência e titulação em RMN de <sup>1</sup>H;
- ❖ Realizar a ancoragem molecular para verificar a interação entre os compostos químicos presentes no OESG e os sítios ativos da AChE;
- ❖ Realizar a validação de métodos de dosagem do OESG usando cromatografia gasosa com detector de massas (CG-MS);
- ❖ Otimizar a produção, caracterizar e determinar a estabilidade das nanocápsulas de poli (L-ácido láctico-co-ácido glicólico) (PLGA) contendo o OESG por meio do planejamento experimental do tipo Box-Behnken;
- ❖ Realizar o doseamento do OESG disperso no interior das nanocápsulas;
- ❖ Efetuar a ligação da sonda fluorescente de vermelho Nilo na superfície da nanocápsula, assim como realizar a caracterização deste sistema;
- ❖ Avaliar a atividade protetora do óleo essencial in natura e nanoencapsulado por meios dos ensaios *in vivo* utilizando o nematódeo *Caenorhabditis elegans*;

- ❖ Verificar a toxicidade do OESG por meio do ensaio de sobrevivência utilizando o *Caenorhabditis elegans*;
- ❖ Verificar se o OESG é capaz de evitar o estresse proteotóxico por meio do ensaio de paralisia induzida pelo peptídeo  $\beta$ -amiloide;
- ❖ Realizar os ensaios *in vitro* e *in vivo* para avaliar a atividade antioxidante do OESG;
- ❖ Determinar a atividade anticolinesterásica do OESG em modelos *in vivo* utilizando o *Caenorhabditis elegans*;

## **Capítulo 1 – Efeito inibitório do óleo essencial de *Siparuna guianensis* Aubl. contra a enzima acetilcolinesterase: insights de fluorescência, titulação de RMN $^1\text{H}$ e estudos de acoplamento molecular.**

### **3 METODOLOGIA**

#### **3.1 Material Vegetal**

As folhas frescas (Figura 18) da planta *Siparuna guianensis* Aubl. foram coletadas manualmente de aproximadamente 10 indivíduos, entre 8:00 e 9:00 horas, durante o período chuvoso, georreferenciados para a análise fenológica na localização 2°44'05.2"N 60°33'17.0"W, no município do Cantá - RR. Posteriormente as folhas frescas foram acondicionadas e transportadas ao laboratório de química ambiental, automação e instrumentação da Universidade Federal de Roraima (UFRR), onde foi realizada a extração do óleo essencial. Espécimes-testemunhas foram encaminhadas ao herbário da UFRR as quais foram depositadas sob o número de tombo 7812.

Figura 18 – Folhas frescas da planta *Siparuna guianensis* Aubl.



fonte: O autor.

#### **3.2 Extração do óleo essencial**

O óleo essencial da planta *Siparuna guianensis* Aubl. foi obtido por hidrodestilação usando um aparelho do tipo Clevenger com condensador duplo Spell. As folhas frescas bem preservadas

foram cortadas em tamanho de aproximadamente 1 cm<sup>2</sup>, pesando 500 g desses fragmentos, e posteriormente colocadas em um balão de fundo redondo de volume igual a 12 L com 6 L de água destilada (Figura 19). O balão foi aquecido em uma manta térmica por 2 horas a 100 °C. Dados da literatura mostram que o rendimento do óleo essencial desta espécie permanece constante após o período de 120 minutos do início da ebulição (PORTELLA et al, 2014).

Figura 19 – Processo de hidrodestilação das folhas frescas da planta *Siparuna guianensis* Aubl.



Fonte: O autor.

A massa do óleo foi mensurada em balança analítica, secos por sulfato de sódio anidro, filtrado através de membrana de celulose 0,22 µm e acondicionado em frasco de vidro borossilicato, o qual foi mantido sob refrigeração em uma atmosfera de -20°C até o momento das análises químicas e testes biológicos (XAVIER-JÚNIOR et al, 2017). Seu rendimento foi calculado através da razão entre a massa do óleo e a massa do material vegetal conforme a equação 1 (SANTOS et al, 2004):

$$\text{Rendimento (\%)} = \frac{\text{Massa do óleo extraído}}{\text{Massa do material vegetal}} \times 100\%$$

### **3.3 Composição química do óleo essencial**

#### **3.3.1 Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de massas (CG-EM)**

A identificação dos compostos do óleo essencial de negramina foi realizada utilizando um GC-MS (QP2010) sistema ULTRA (Shimadzu) com uma Rxi - 1MS 30 m x 0,25 mm x 0,25  $\mu$ M (Restek) a temperaturas que variam de 50°C (2min), aumentando em intervalos de 3°C/min até 230°C. A injeção temperatura foi de 250°C numa razão de divisão de 1:10, o gás espectrometria de massa de cromatografia (GC-MS) temperatura de interface era de 250°C, e o detector de MS operado a um impacto de electrónico 70eV a 250°C. Hélio foi utilizado como gás transportador, a um caudal de 2,0 ml/min e um volume de injeção de 1 mL. A aquisição de dados GCMS solução de software (Shimadzu) foi usada para avaliar a componentes, e os índices foram comparados com aqueles do Instituto Nacional de Padrões e Tecnologia (NIST) espectral biblioteca NIST11 com base no índice de Kovats, um linear índice de retenção usado para identificar componentes do óleo com os cálculos incluindo o tempo de retenção de uma série de n-alcanos.

#### **3.3.2 Cromatografia Gasosa de Alta Resolução (CG-FID)**

Um cromatógrafo a gás HP 7820A (Agilent) foi usado para o gás detecção de ionização de cromatografia de chama (GC-FID), colunas HP5 ocupadas com dimensões de 30 m x 0,32 milímetros x 0,25  $\mu$ M (Agilent), temperaturas que variam de 50 °C (2 min), com aumentos de 3 °C min<sup>-1</sup>, até 230 °C. A temperatura de injeção foi de 250 °C em uma divisão proporção de 1:10, e a temperatura foi FID 250 °C. O hidrogênio (H<sub>2</sub>) foi utilizado como gás transportador, a 3 ml/min e um volume de injeção de 1  $\mu$ l. O software de aquisição de dados foi EZChrom Elite Compact (Agilent). As análises foram realizadas em triplicata e os dados quantitativos obtidos por integração eletrônica da área do pico em relação à área total do cromatograma, o que resultou na concentração (%) de cada fitocomponente presente no óleo essencial.

### 3.4 Inibição da acetilcolinesterase

#### 3.4.1 Obtenção das enzimas

Os extratos de AChE dos olhos de *camarão* (*Litopenaeus vannamei*) e das brânquias de ostra de mangue (*Crassostrea rhizophorae*) foram obtidos por homogeneização de 20 mg de tecido por mL de 0,5 mol/L Tris-HCl pH 8.0 e centrifuga de 10.000 x g por 10 minutos. O sobrenadante (extrato bruto) foi coletado e mantido em -20 °C para análises mais aprofundadas. A AChE comercial de *Electrophorus electricus* extraída do órgão elétrico (Tipo VI-S, Sigma-Aldrich) também foi usado em alguns dos ensaios.

#### 3.4.2 Atividade enzimática

Uma alíquota de 200 µL do reagente cromogênico DTNB de 0,25 mM em Tris-HCl 0,5 M pH 7,4 foi misturada com 20 µL da enzima comercial ou extrato bruto. A reação começou pela adição de substrato (20 µL de iodeto de acetiltiocolina 62 mM). O branco foi preparado com tampão Tris-HCl 0,5 M, pH 8,0, em vez do extrato. A degradação da acetiltiocolina foi medida espectrofotometricamente após 3 min a 405 nm. As unidades de atividade da AChE (U) foram definidas como a quantidade de enzima que decompõe 1 µmol de acetiltiocolina por min a 25 °C. A atividade específica é expressa em U por mg de proteína. A proteína foi determinada pelo método de Bradford (1976), adaptado por Sedmak e Grossberg (1977).

#### 3.4.3 Ensaios de inibição

A AChE de *C. rhizophorae* guelra, o olho de *L. vannamei* e o órgão elétrico de *E. electricus* foram expostos ao OESG, incubando 10 µL da AChE comercial ou extratos brutos (na concentração indicada na seção 3.4.1) com 10 µL de óleo essencial (em seis concentrações variando de  $4,5 \times 10^{-10}$  a  $4,5 \times 10^{-5}$  M do composto principal), por 60 min (ASSIS et al., 2012). A atividade enzimática foi determinada de acordo com a metodologia descrita acima (seção 2.4.2) e a atividade residual foi calculada usando a ausência de óleo essencial como 100% de atividade. Os resultados foram expressos em porcentagem de inibição da atividade residual (média  $\pm$  DP) versus

concentração do principal composto do OESG, para estimar o IC<sub>20</sub> e o IC<sub>50</sub> (concentrações que inibem a atividade enzimática em 20 e 50%, respectivamente) parâmetros.

Para a determinação do mecanismo de inibição pelo óleo essencial, a cinética enzimática com acetilcolina (concentração final de 0,83 a 20,83 mmol L<sup>-1</sup>) exposta ao óleo essencial (4,5x10<sup>-11</sup> a 4,5x10<sup>-8</sup> M de shyobunona) por 60 min para obter gráficos hiperbólicos (gráficos de Michaelis-Menten). A partir de sua linearização (gráficos Lineweaver-Burk), determinou-se a constante de Michaelis-Menten (Km) e a taxa máxima de hidrólise (Vmax) em relação à ausência e presença de óleo essencial.

### 3.5 Titulação de supressão de fluorescência

Os espectros de emissão de fluorescência foram medidos em três temperaturas diferentes (25, 30 e 35 °C) em um espectrofluorímetro Jasco FP-6300. O dispositivo foi configurado para excitar a proteína em 290 nm e a emissão foi monitorada entre os comprimentos de onda de 290 nm e de 400 nm. Uma solução de 3,0 mL contendo 50 µL.mL<sup>-1</sup> *E. electricus* AChE foi adicionada a um cuvette de quartzo, em seguida, titulada por sucessiva adição de óleo essencial usando uma pipeta (para concentrações finais que variam de 0,25x10<sup>-6</sup> M a 0,9x10<sup>-6</sup> M). A constante Stern-Volmer (Ksv) foi definida pela relação entre as intensidades inicial e final do espectro, de acordo com a Equação 1, com concentrações crescentes de compostos na titulação.

$$\frac{F_0}{F} = 1 + k_q \cdot t_0 = 1 + K_{sv} [Q] \quad (1)$$

As constantes de associação (Ka), bem como o número de sítios de ligação (n), foram calculados usando a Equação 2 (LAKOWICZ, 2006).

$$\log \left( \frac{F_0 - F}{F} \right) = \log[Ka] + n \log[Q] \quad (2)$$

### 3.6 Titulação em RMN $^1\text{H}$

Os estudos de titulação de RMN  $^1\text{H}$  foram realizados para investigar a interação entre o OESG e a enzima AChE. Foi preparada uma dispersão com 500  $\mu\text{L}$  do óleo essencial em dimetilsulfóxido deuterado (DMSO- $d_6$ ) e em seguida foi titulado uma solução de acetilcolinesterase usando uma micropipeta (para concentrações finais variando de 10  $\mu\text{L}$  a 30 $\mu\text{L}$   $\text{mL}^{-1}$ ). Após cada adição de acetilcolinesterase, o espectro de RMN  $^1\text{H}$  foi registrado e as alterações no deslocamento químico dos prótons foram anotadas.

### 3.7 Ancoragem Molecular

Como não há estruturas tridimensionais para o eletrólito elétrico acetilcolinesterase (eeAChE) com resolução alta o suficiente para experimentos de ancoragem, a estrutura utilizada para os encaixes foi obtida por modelagem de homologia. A sequência eeAChE é constituída por 633 aminoácidos, dos quais os primeiros 23 são um péptido de sinalização, e foi obtido a partir de UniProtKB (entrada O42275). Usamos o servidor Swiss-Model para encontrar modelos adequados e o modelo de homologia foi construído usando a estrutura cristalina de Tetronarce californica AChE obtida na resolução de 2,22 Å (PDBID 6EUC), que compartilha 70,75% de identidade de sequência com eeAChE e contém uma oxima ligado ao desfiladeiro catalítico.

Todas as docagens foram realizadas com o AutoDock Vina. Inicialmente, uma ancoragem cega exploratória foi realizada com a shyobunona, na tentativa de localizar sítios de ligação alternativos, usando uma grade grande o suficiente para abranger toda a proteína (60 Å  $\times$  60 Å  $\times$  60 Å). Valores para exaustividade de 8, 16, 24, 50, 100, 200 e 500 foram utilizados. Todas as poses de encaixe geradas estavam na região do sulco de união, então esta região foi usada para um estudo mais detalhado com uma grade menor (24,375 Å  $\times$  24,375 Å  $\times$  26,25 Å) centrada no sulco, exaustividade = 100 e cinco repetições para cada molécula, imprimindo até 20 modos de ligação e resultados dentro de 5  $\text{kcal mol}^{-1}$  da posição de energia mais baixa.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Composição Química

Em relação à variação das classes de compostos presentes no OESG, verificou-se que os monoterpenos e sesquiterpenos hidrocarbonetos apresentaram um conteúdo de 16% e 24%, respectivamente. Já os monoterpenos e sesquiterpenos oxigenados apresentaram teores de 8% e 52%. Os principais componentes químicos caracterizados estão resumidos na Tabela 2.

Tabela 2 - Constituintes químicos identificados no OESG destacando-se em negrito os principais componentes

Pico	RT (min)	OESG (%)	IK (Calculado)	Composto
1	7,580	1,6	929	$\alpha$ -pineno
2	9,052	0,3	965	$\beta$ -pineno
4	9,565	0,4	978	mirceno
7	11,015	0,7	1014	E- $\beta$ -ocimeno
14	22,460	0,2	1298	2-undecanona
15	26,658	1,4	1402	$\beta$ -bourboneno
17	29,208	0,3	1466	$\gamma$ -muuroleno
18	30,285	2,7	1492	shyobunona
<b>19</b>	<b>30,710</b>	<b>6,1</b>	<b>1503</b>	<b><math>\alpha</math>-muuroleno</b>
20	30,917	4,1	1508	guaiadieno
<b>21</b>	<b>31,582</b>	<b>18,9</b>	<b>1525</b>	<b>epi-shyobunona</b>
22	31,965	2,2	1534	$\delta$ -cadineno
23	33,242	3,6	1566	elemol
24	33,732	0,3	1578	germacreno B
25	34,042	3,7	1586	espatulenol
26	34,412	0,3	1595	guaiol
<b>27</b>	<b>35,082</b>	<b>23,9</b>	<b>1611</b>	<b>iso-shyobunona</b>
28	35,670	1,0	1626	dilapiol
29	36,612	4,8	1649	$\gamma$ -eudesmol
<b>30</b>	<b>36,810</b>	<b>5,1</b>	<b>1654</b>	<b>t-muurolol</b>
31	38,632	2,2	1700	epi- $\alpha$ -bisabolol
32	39,595	1,2	1723	farnesol 2Z-6E
33	40,252	1,6	1740	farnesol 2E-6E
34	46,513	2,2	1895	acetato de farnesila
35	47,142	1,3	1911	acetona de farnesila
		10,0		outros

Legenda: \*RT = retention time (minutes). \*\*IK = Kovats Index.

Entre os compostos que fazem parte da complexa mistura de óleo essencial, destacaram-se o composto shyobunona e seus derivados, que não foram identificados em nenhuma outra pesquisa envolvendo a espécie *Siparuna guianensis* Aubl. Além disso, a iso-shyobunona (23,9%) e a epi-shyobunona (18,9%) são consideradas os componentes majoritários cuja soma chega a mais de 40% da composição total do óleo e pode ser considerada uma fonte alternativa de origem natural.

Esta espécie possui uma característica interessante em relação à composição química do óleo essencial, variando as substâncias produzidas pela planta de acordo com a região em que é encontrada. Em Valentini, (2010) o óleo essencial foi obtido de amostras da região do cerrado brasileiro, onde, além das substâncias comumente caracterizadas, foi identificada a presença de sesquiterpenos oxigenados com siparunona (variando ao longo do ano de 30% a 80%) como componente principal. Segundo Aguiar e colaboradores (2015) em sua pesquisa realizada no Formoso do Araguaia - TO, os compostos com maiores teores foram o  $\beta$ -Mirceno (79,71%) e 2-undecanona (14,58%).

## 4.2 Ensaio Enzimáticos

A inibição in vitro da AChE de extratos de ostra e camarão expostos ao OESG está representada na Tabela 3.

Tabela 3 - Inibição média da AChE de *C. rhizophorae*, *L. vannamei* e *E. electricus* pelo OESG

Amostra	<i>C. rhizophorae</i> AChE	<i>L. vannamei</i> AChE	<i>E. electricus</i> AChE
EOSG	Inibição %	Inibição %	Inibição %
	78,07 $\pm$ 0,94	100 $\pm$ 3,29	100 $\pm$ 2,25

A inibição da atividade da AChE é um importante mecanismo de ação envolvido em pesquisas direcionadas à busca de novos medicamentos anticolinesterásicos, pois demonstram maior eficiência no tratamento clínico da doença de Alzheimer (SHAL et al, 2018). Esta doença está associada a "déficits" de vários neurotransmissores cerebrais, como a acetilcolina, que é hidrolisada pela AChE com uma meia-vida reduzida, dificultando a comunicação entre os neurônios. Além disso, o tratamento sintomático da doença envolve principalmente a restauração da função colinérgica, aumentando o nível de acetilcolina pela inibição da AChE, o que poderia ser útil para melhorar a qualidade de vida dos pacientes afetados pela doença (SOUZA et al, 2018).

Os ensaios enzimáticos para estimar as concentrações inibitórias de IC<sub>20</sub> e IC<sub>50</sub> do óleo essencial, também foi utilizada a enzima comercial extraída da enguia elétrica (*Electrophorus electricus*), sendo a mais sensível na presença do OESG (Tabela 4). Como observado nesta tabela, os valores de IC<sub>20</sub> e IC<sub>50</sub> relacionados ao OESG foram inferiores aos da Neostigmina clássico inibidor de AChE, mostrando uma maior afinidade pela enzima e maior efeito inibitório.

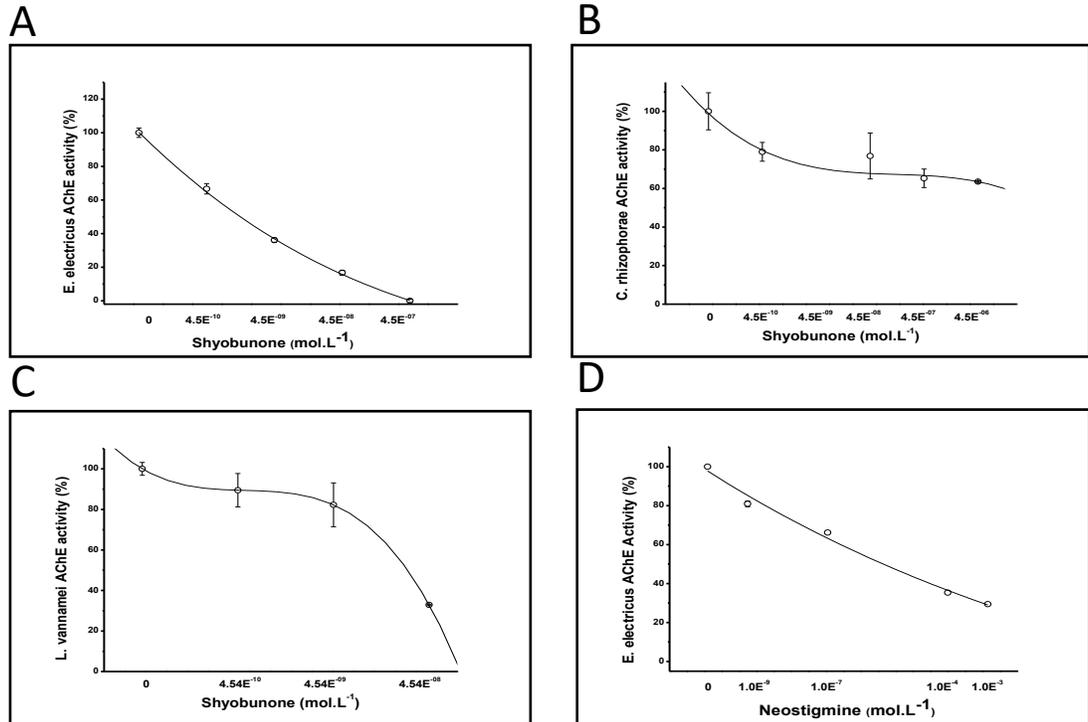
Tabela 4 - Valores de IC<sub>20</sub> e IC<sub>50</sub> relacionados à exposição in vitro de AChE de três tipos de organismos aquáticos (molusco, crustáceo e peixe) a shyobunona e derivados do OESG (45,5%)

Espécies	Shyobunona/derivados	
	IC <sub>20</sub> (mol.L <sup>-1</sup> )	IC <sub>50</sub> (mol.L <sup>-1</sup> )
<i>C. rhizophorae</i>	8,02 x 10 <sup>-10</sup>	-
<i>L. vannamei</i>	1,21 x 10 <sup>-8</sup>	3,17 x 10 <sup>-5</sup>
<i>E. electricus</i>	1,57 x 10 <sup>-10</sup>	1,45 x 10 <sup>-9</sup>
	Neostigmina	
<i>E. electricus</i>	2,61 x 10 <sup>-8</sup>	2,30 x 10 <sup>-5</sup>

Os parâmetros IC<sub>20</sub> e IC<sub>50</sub> são importantes para comparar o efeito dos compostos anticolinesterásicos, porque a inibição de 20% é o limite inferior a partir do qual a presença de tais substâncias é detectada (FAO, 2007). Além disso, o parâmetro consumo diário aceitável (ADI) de um composto é estimado a partir do seu IC<sub>20</sub> relacionado a AChE das espécies mais sensíveis. Uma inibição igual ou superior a 50% da atividade da AChE marca o início de sinais e sintomas, enquanto inibição acima de 90% significa morte (FAO, 2007).

A inibição da AChE pelo óleo essencial da planta *Siparuna guianensis* foi testada, sendo que este teste avaliou a capacidade das moléculas presentes na composição do óleo essencial em inibir a atividade da AChE, aumentando sua concentração em uma solução com uma concentração constante da enzima. Os resultados nas próximas seções da titulação de RMN de 1H e do acoplamento molecular sugerem que a inibição da AChE se deve à presença de shyobunona e seus derivados (iso-shyobunona e epi-shyobunona), levando em consideração o alto conteúdo dessas substâncias no óleo essencial. Portanto, todos os compostos derivados de shyobunona exibiram um efeito inibitório contra AChE, comparável e ainda mais alto ao efeito exercido pelo neostigmina inibidor clássico da AChE (Figura 20).

Figura 20. Efeito dos compostos majoritários do OESG (shyobunona/derivados) sobre a atividade de AChE.

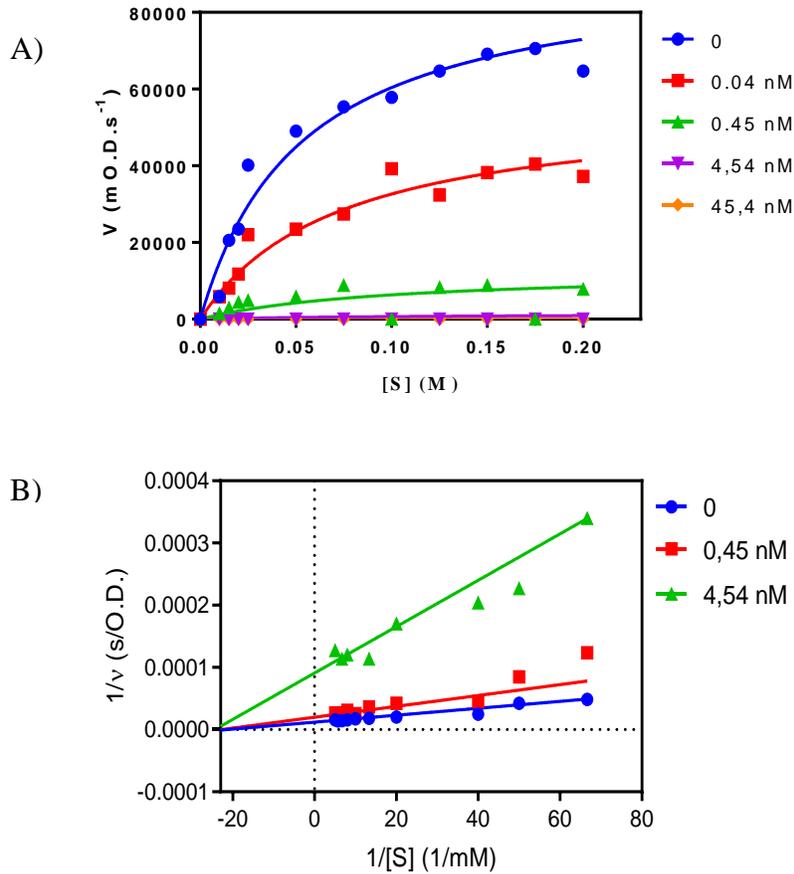


Legenda: Os dados são expressos como média  $\pm$  SD. Todos os ensaios foram realizados a 25 °C. (A) *E. electricus*, (B) *C. rhizophorae* e (C) *L. vannamei*. (D) Efeito do inibidor padrão da AChE Neostigmina em *E.*

### 4.3 Mecanismo e tipo de inibição do óleo essencial

Em um estudo de inibição enzimática é essencial elucidar o tipo de mecanismo de interação que está ocorrendo entre a enzima e a substância inibitória (MOREIRA et al, 2022). A constante de inibição do complexo inibidor do substrato acetilcolina foi obtida através da metodologia Lineweaver-Burk utilizando o software Prism GraphPad 8.0. Apresentando um comportamento típico descrito pelo modelo Michaelis-Menten e por meio de sua linearização, foram obtidos os valores das constantes  $K_m = 0.04637$  mmol / L,  $V_{max} = 83312$  mU / mg proteína e constante de inibição (KI) 0.8 nmol / L (Figura 21). Considerando a shyobunona e seus derivados como principais componentes do OESG, eles foram selecionados para a determinação do mecanismo de inibição. O comportamento apresentou atividade compatível com o modelo Michaelis-Menten, e de acordo com o gráfico de Lineweaver-Burke, o mecanismo de inibição foi identificado como não-competitivo (Figura 21).

Figura 21 - Cinética de inibição de AChE na presença do OESG.



Legenda: (A) em concentrações do composto principal (shyobunona e derivados) de 0 a 45,4 nM, descrito pelo modelo de Michaelis-Menten, usando uma concentração de enzima de  $0,1 \mu\text{g mL}^{-1}$  e o substrato acetilcolina variando de 10 a 200 mM, definindo o mecanismo de inibição como competitivo. (B): Gráfico de Lineweaver-Burk mAChE at 0 nM (círculo), 0.45 nM (quadrado), 4,54 mM (triângulo) da shyobunona presente no EOSG.

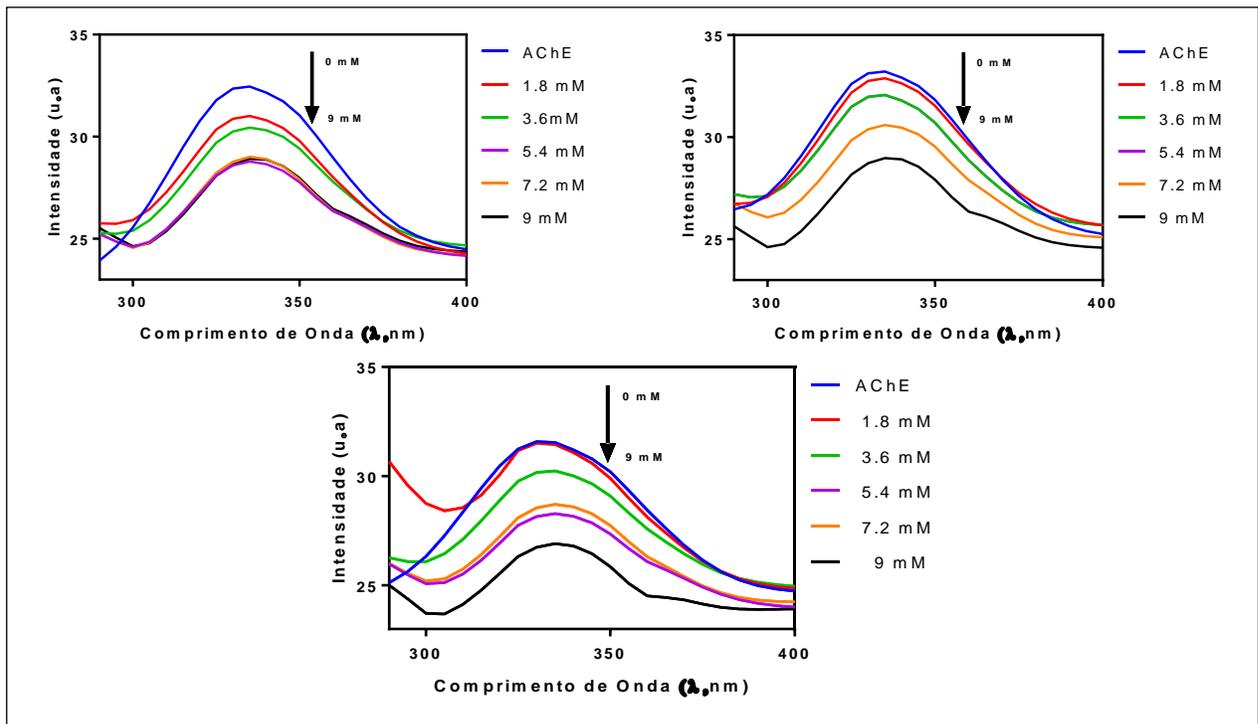
Ao realizar um estudo de inibição de uma determinada enzima por um determinado composto, é interessante considerar a reversibilidade da interação na reação enzimática. O teste teve como objetivo avaliar a reversibilidade do efeito inibitório pelo óleo essencial. O experimento resultou em um conjunto de curvas não lineares geradas pelo modelo Michaelis-Menten, com seus coeficientes angulares diminuídos com o aumento da concentração do inibidor e por meio de sua linearização foi obtido o gráfico de Lineweaver – Burke (Figura 2). Em relação ao gráfico obtido, com o aumento da concentração do inibidor (OESG) há um aumento na velocidade da reação isso significa que o inibidor se liga a enzima formando o complexo EI, uma vez que a concentração do substrato permanece constante. Analisando o gráfico duplo recíproco de Lineweaver-Burke e levando em consideração os resultados espectrofotométricos que sugerem que as ligações formadas

entre a enzima e o inibidor são do tipo Van der Waals (interações com baixa energia de ligação), pode-se sugerir que o mecanismo de inibição foi não-competitivo, porém reversível (ARAÚJO et al, 2018; MARTINS, 2015).

#### 4.4 Titulação por supressão de fluorescência

A técnica de titulação por extinção por fluorescência é amplamente utilizada para avaliar as interações entre ligantes e proteínas (MU et al., 2013; XIE et al., 2016). Portanto, para avaliar a interação entre o OESG e a enzima acetilcolinesterase, foram obtidos espectros de emissão de fluorescência da acetilcolinesterase na ausência e presença de amostras de óleo excitadas a 290 nm, mostradas na Figura 22.

Figura 22 – Gráficos de supressão de fluorescência da interação entre o OESG e a AChE.

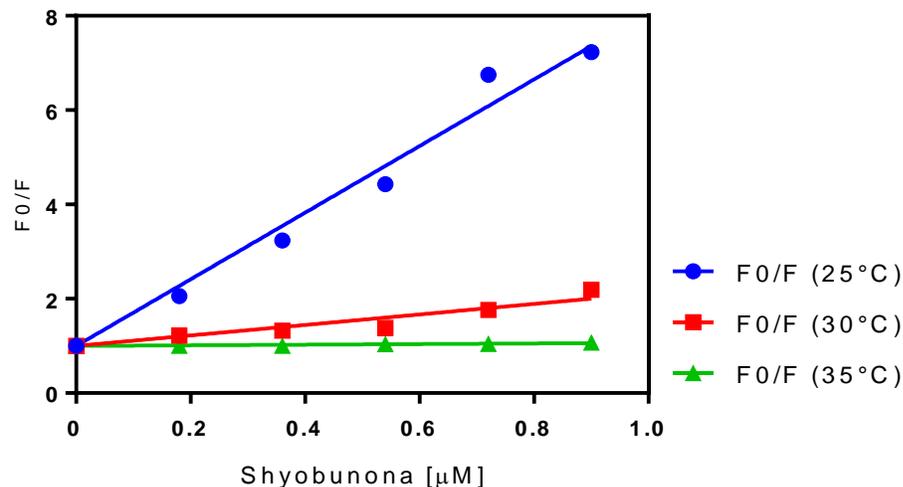


Legenda - Espectros de supressão de fluorescência de interação entre o OESG e a AChE (*Electrophorus electricus*) a 25°C (a), 30°C (b) e 35°C (c) ( $\lambda_{exc.} = 290 \text{ nm}$ ), em tampão Tris-HCl 0,5 M, pH 7,4, na presença do OESG. A enzima foi mantida a uma concentração de 0,67 mg/mL e o óleo essencial também foi titulado separadamente (como pano de fundo para subtrair) nas concentrações de 1,8 a 9 mM.

Como o OESG foi titulado na solução contendo a enzima acetilcolinesterase, o espectro de fluorescência mostrou uma diminuição na sua intensidade, indicando a supressão causada pelo inibidor.

A redução da intensidade da fluorescência é descrita pela equação de Stern-Volmer, onde é usada a razão entre as intensidades máximas de fluorescência da proteína sem e com o supressor, para cada concentração do OESG (Equação 1). Os valores de  $K_{SV}$  para o sistema AChE - óleo essencial foram obtidos por regressões lineares. O efeito do óleo essencial segue um comportamento linear quando é utilizada a equação de Stern-Volmer, apresentando uma linha reta que sofre uma deterioração à medida que a temperatura aumenta (Figura 23).

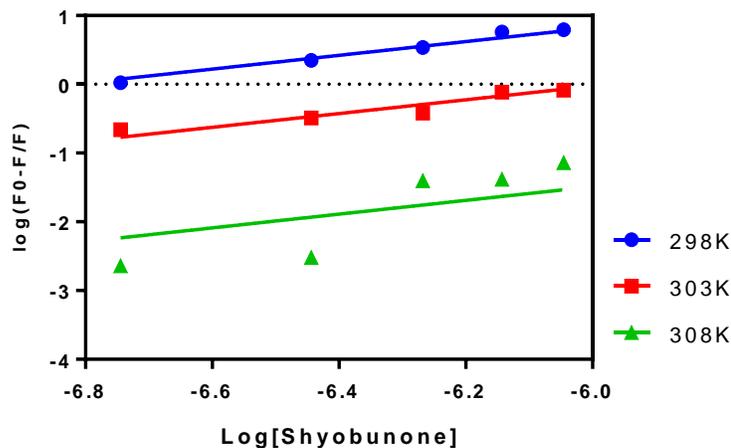
Figura 23 - Gráfico de Stern-Volmer



Legenda: supressão da intensidade da fluorescência de AChE pelo OESG. A titulação foi realizada em três temperaturas de 25 °C, 30 °C e 35 °C.

Utilizando o gráfico  $\log x \log$ , foi possível obter as constantes relacionadas à supressão da enzima na presença do óleo essencial (Figura 24). A linearidade foi observada e as constantes de ligação ( $K_a$ ) e o número de sítios de ligantes ( $n$ ) foram calculados a partir dos coeficientes angular e linear usando a Equação 2 (Tabela 5).

Figura 24 – Linearidade do gráfico de Stern Volmer



Legenda: titulação do OESG na presença de AChE na concentração de 0,67 mg/mL.

Tabela 5 – Constante de Stern-Volmer ( $K_{SV}$ ) e constante de ligação ( $K_a$ ) em temperaturas diferentes

Composto	Temperatura(°C)	$K_{SV}$ ( $10^6 M^{-1}$ )	$K_a$ ( $10^9 M^{-1}$ )	N
Shyobunona/derivados	25	7,06	6,6	1
Shyobunona/derivados	30	1,1	0,9	1
Shyobunona/derivados	35	0,066	0,03	1

À medida que a temperatura aumentou em relação a supressão, a constante Stern-Volmer diminuiu e a reação foi caracterizada como supressão estática. Os valores de  $\Delta H$  e  $\Delta S$  foram  $405.322 \text{ kJ mol}^{-1}$  e  $1.303 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ , respectivamente, sugerindo que o processo de ligação foi principalmente exotérmico com entalpia favorável, e as ligações de hidrogênio e as forças de Van der Waals desempenharam um papel fundamental na ligação.

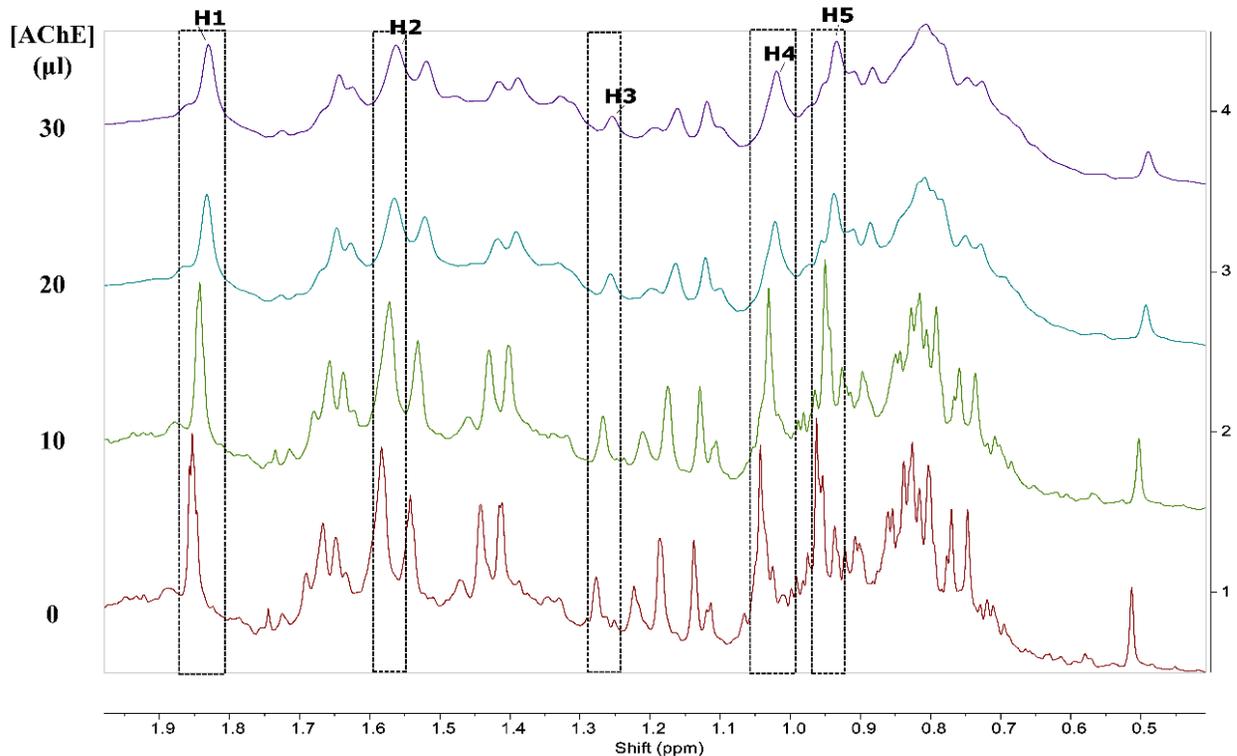
#### 4.5 Titulação em RMN $^1\text{H}$

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  pode se tornar uma ferramenta útil que permite a análise de átomos de hidrogênio envolvidos nas interações entre substâncias e biomoléculas (XU et al, 2017). Para as interações analisadas levou-se em consideração que a enzima AChE interage integralmente com o composto majoritário shyobunona, conforme minudenciado nos resultados *in silico*. Ao longo da titulação da AChE na solução do inibidor, demonstra-se o gradual deslocamento dos picos relativos à shyobunona na direção de alto campo, isto é, está ocorrendo a blindagem dos hidrogênios do composto durante o contato com a AChE. Este fato indica um aumento de densidade eletrônica nos

hidrogênios do composto, podendo significar que ligações de hidrogênio estão envolvidas na interação entre a AChE e o inibidor.

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  e o assinalamento de hidrogênios participantes da interação são demonstrados na Figura 16. Se observou maior diferença de deslocamento no H5 com  $\Delta\delta = 0.03$  ppm, hidrogênio correspondente à um dos grupos metilas presentes na molécula. Em concordância com o ambiente químico o qual se encontra, o pico pertencente a H4, grupo de hidrogênios vizinho a H5, também apresenta relevante interação, se deslocando de 1.04 a 1.01 ppm ( $\Delta\delta = 0.0244$  ppm). O pico relacionado à H2 ( $\Delta\delta = 0.0199$  ppm) é constituído pelos deslocamentos de dois hidrogênios distintos (H2<sub>a</sub> e H2<sub>b</sub>), já H3 apesar de se encontrar ligado no mesmo carbono que H2<sub>a</sub> tem interação mais acentuada com a enzima, apresentando  $\Delta\delta = 0.0233$  ppm. O deslocamento de H1, que passou de 1.8526 a 1.8288 ppm mostra o envolvimento deste grupo metila na interação com a acetilcolinesterase ( $\Delta\delta = 0.0238$  ppm) (Tabela 25).

Figura 25: Espectro de RMN  $^1\text{H}$  da titulação da AChE.



Legenda: Titulação em RMN  $^1\text{H}$  da enzima AChE (0,67 mg/ml) no OESG diluído em DMSO-d<sub>6</sub>. A titulação foi realizada com AChE de 0 (linha vermelha), 10 (linha verde), 20 (linha azul) e 30 uL (linha roxa).

Tabela 6 – Mudanças químicas de prótons causadas após interações

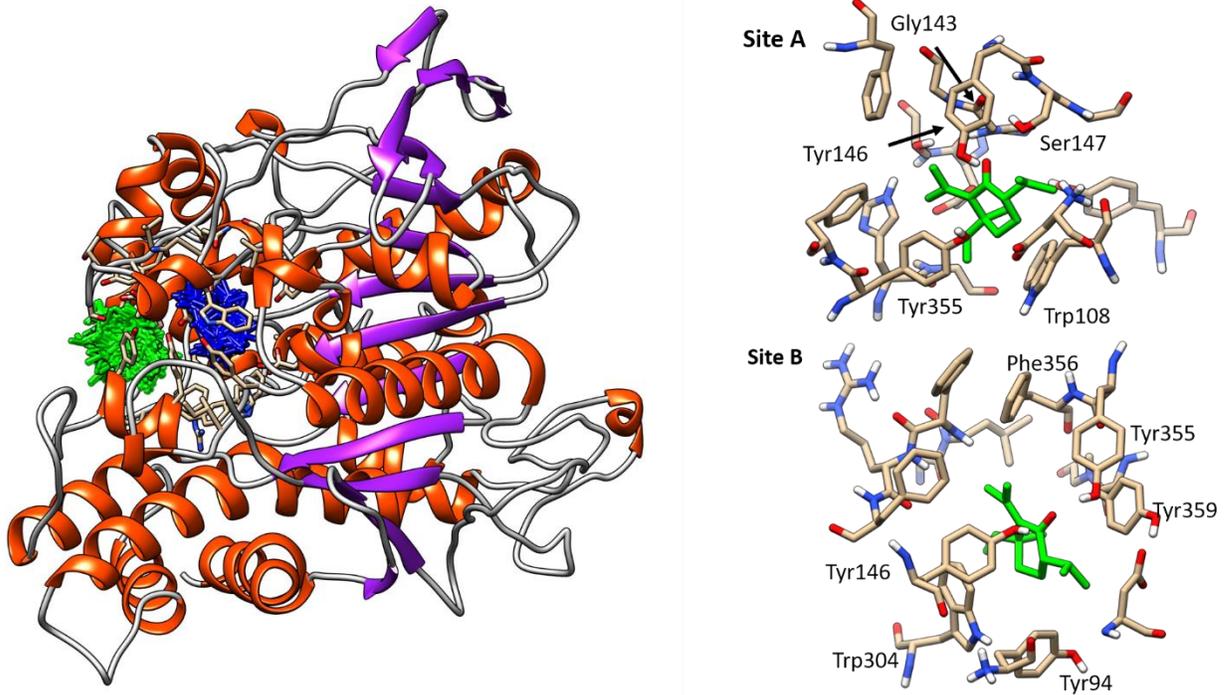
[AChE] 0.67mg.ml <sup>-1</sup>	Hidrogênio (H)	$\delta$ (ppm)	$\Delta\delta$ (ppm)
0 uL	H4	1,0431	0
10 uL		1,0301	0,013
25 uL		1,0212	0,0219
30 uL		1,0187	0,0244
0 uL	H5	0,9625	0
10 uL		0,9508	0,0117
25 uL		0,9380	0,0245
30 uL		0,9325	0,03
0 uL	H3	1,2767	0
10 uL		1,2663	0,0104
25 uL		1,2554	0,0213
30 uL		1,2534	0,0233
0 uL	H2	1,5813	0
10 uL		1,5723	0,009
25 uL		1,5649	0,0164
30 uL		1,5614	0,0199
0 uL	H1	1,8526	0
10 uL		1,8417	0,0109
25 uL		1,8328	0,0198
30 uL		1,8288	0,0238

#### 4.6 Docking Molecular

De acordo com os dados do docking molecular, todos os derivados de shyobunona se ligam fortemente ao sítio ativo do AChE, em particular, a iso-shyobunona parece estabelecer uma ligação ainda mais forte, sendo que esta substância constitui 25% da composição do óleo, podendo ser considerada relevante na concentração de óleo e provável inibidor de AChE.

Em todos os casos, o AutoDock Vina relata que as moléculas se ligam basicamente a duas regiões predominantemente hidrofóbicas do sulco de ligação (Figura 26). No local mais interno (A), os ligandos são envolvidos por Asp96, Trp108, Gly142-144, Tyr146, Ser147, Gly148, Tyr155, Glu224, Ser225, Phe315, Tyr355, Phe356, His494 e Gly495. Na bolsa mais externa (B), o ligando é rodeado por Tyr94, Asp96, Tyr146, Trp304, Gly311, Leu312, Phe313, Arg314, Phe315, Tyr355, Phe356, Tyr359 e Gly360.

Figura 26 - Estrutura do ccAChE mostrando os dois locais de ligação localizados nos trechos de atracação.

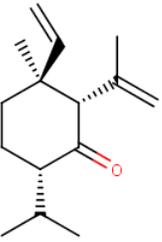
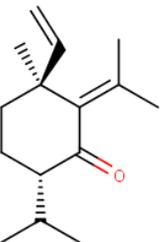
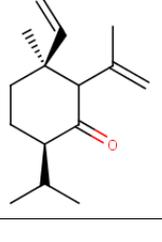
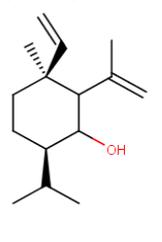


Legenda: Esquerda: todas as poses geradas pelo AutoDock Vina para todos os ligantes. Azul: ligantes no local A; Verde: ligantes no local B. Direita: Superfícies APBS dos locais A (superior) e B (inferior), mostrando apenas uma melhor posição marcada em cada caso. A escala de cores está em kcal/mol.

A Tabela 7 lista os resultados mais relevantes obtidos. Em geral, a maioria das moléculas se ligam ligeiramente mais forte no local A, com interações hidrofóbicas persistentes com Trp108 e Tyr355. Tyr146 está no limite de ambos os locais, e é capaz de atuar como doador de ligação H para as moléculas em ambos os lados, com exceção do epi-shyobunol, que atua como doador de ligação H para Tyr355: O e Gly143: N no local A, e para Tyr146: O no local B. No geral, prevê-se que a iso-shyobunona seja o ligante mais forte, mas apenas por uma pequena diferença.

Existem 3 estruturas depositadas no banco de dados de proteínas (PDB). Todos eles têm resolução > 4,0 Å. Além disso, após uma inspeção mais detalhada, notamos que a sequência disponível (FASTA) para todas as estruturas não concorda com a sequência publicada no artigo [Bourne: JBC1999].

Tabela 7 - Resultados relevantes do AutoDock Vina

Molécula	Poses		Energia de ligação (Kcal.mol <sup>-1</sup> )	Principais interações hidrofóbicas	Principais Ligação - H	
	Total	By pocket				
Shyobunona 	89	A	22	-7,2	Trp108 Tyr355	Tyr146 Ser147 Gly143 Tyr355 Ser255
		B	67	-7,2	Trp304 Tyr359 Tyr94 Phe356	Tyr146
Iso-shyobunona 	88	A	15	-8,0	Trp108 Tyr355	Tyr146 Ser147 Trp108 Gly143
		B	73	-7,6	Trp304 Tyr359 Tyr94 Phe356	Tyr146 Tyr94
Epi-shyobunona 	96	A	25	-7,7	Trp108 Tyr355 Gly143	Ser147 Gly143 Tyr355 Tyr146
		B	71	-6,9	Trp304 Tyr359	Tyr146 Gly360 Tyr359
Epi-shyobunol 	99	A	30	-7,7	Trp108 Tyr355 Phe356	Tyr355 Gly143
		B	69	-7,1	Trp304 Tyr359 Phe356 Tyr94	Tyr146

## **Capítulo 2: Avaliação da atividade protetora do óleo essencial de *Siparuna guianensis* Aubl. utilizando o modelo *in vivo* *Caenorhabditis elegans***

### **5. Material e Métodos**

#### **5.1 *Caenorhabditis elegans*: cepas, manutenção e sincronização.**

As cepas utilizadas neste trabalho foram a do tipo selvagem N2 e a cepa transgênica CL 2006 dvl2 [pCL12(*unc-54*/human Abeta peptide 1-42 minigene) + pRF4] as quais foram obtidas no *Centro de Genética de Caenorhabditis* (CGC, Universidade de Minnesota, USOS). Os animais utilizados nos experimentos foram cultivados em placas de Petri (60 mm) com NGM (Meio de Crescimento para Nematódeo – NaCl 3 mg/ml; bactopectona 2,5 mg/ml; ágar bacteriológico 17 mg/ml; colesterol 1 mg; CaCl<sub>2</sub> 1 M; MgSO<sub>4</sub> 1 M; KPO<sub>4</sub> 25 M) e a bactéria *Escherichia coli* (OP50) como fonte de alimento. A cepa selvagem N2 foi mantida a 20 °C ± 2 e a cepa transgênica CL 2006 permaneceu a 15 °C ± 2 até o momento dos experimentos. Todos os ensaios foram realizados usando animais hermafroditas e para cada experimento os nematoides foram sincronizados por meio de lise alcalina. A lise alcalina consiste no tratamento de animais hermafroditas adultos grávidos com solução de lise (1% hipoclorito de sódio; 1M NaOH) por até 10 minutos. Os ovos, resistentes a esse processo, são centrifugados e ressuspensos em meio líquido M9 (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,022 M; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,042 M; NaCl 0,085 M; MgSO<sub>4</sub> 0,001 M), e depois mantidos sob agitação em homogeneizador durante a noite, na ausência de alimento. Após a eclosão dos ovos, os animais permanecem no estágio larval L1 devido à ausência de alimento (BRENNER, 1974, STIERNAGLE, 2006).

#### **5.2 Administração do OESG**

Para a diluição do OESG foi usado dimetilsulfóxido (DMSO) em concentração de 0.5% e em seguida a solução mista foi adicionada ao meio de cultura *E. coli* OP50 nas seguintes concentrações indicadas 0, 0.1, 0.25, 0.5 e 1 mg/mL. Após a secagem das placas preparadas com cada concentração de OESG diluído no meio de cultura, elas eram usadas para cultivar o *C. elegans* sempre em estágio larval L1 para ensaios biológicos. Os experimentos foram realizados sempre em triplicata biológica (ZHANG et al, 2020).

### 5.3 Ensaio de inibição da OP50

Inicialmente, preparou-se solução salina com a OP50 suspensa em tubo de ensaio com 5 mL, sendo agitada durante dois minutos em vortex. Após agitação, a suspensão teve sua turbidez comparativa ajustada àquela apresentada pelo tubo 0,5 da escala McFarland, que corresponde aproximadamente a um inóculo de  $10^8$  UFC/mL para bactérias (CHIN LU, 1971; TAVARES, 1984; DRUTZ, 1987; CLEELAND; SQUIRES, 1991). Os experimentos foram realizados com diferentes concentrações OESG (0.015 a 1 mg/mL) e em quadruplicata e em duplicata para cada experimento, sendo a fileira A e B referente ao experimento 1, C e D ao Experimento 3, E e F ao experimento 3. Foram usados 2 controles: DMSO 0.5% e um controle sem OESG.

A leitura do ensaio de microdiluição foi realizada utilizando o método colorimétrico, que consiste na adição de 20  $\mu$ L da solução aquosa da matriz de Resazurina na concentração de 0,01%, que é reconhecida como marcador colorimétrico de óxido- reação de redução (MANN; MARKAN, 1998; SALVAT et al, 2001; BURT; REINDERS, 2003). A mudança de coloração do molde (azul para rosa) indica crescimento microbiano. A menor concentração OESG capaz de inibir o crescimento da cepa testada, verificada para a coloração azul da matriz é considerada como medida da concentração inibitória mínima (MIC) (ESPINEL-INGROF et al, 1992).

### 5.4 Ensaio de sobrevivência em *C. elegans*

Os animais da cepa selvagem N2 foram sincronizados em L1 e usados para avaliar os efeitos do OESG na vida útil e no tempo de geração. Resumidamente, os animais foram cultivados em placas com o e sem o tratamento nas concentrações indicadas anteriormente até atingirem o estágio de L4 onde posteriormente foram transferidos para placas sem tratamento. A leitura dos animais foi realizada a cada 24 h durante 3 dias. Vermes no estágio L4 e acima foram usados para determinar a expectativa de vida, com o dia do estágio L4 sendo considerado o dia 0. Vermes rastejando para fora das placas foram eliminados da análise. Ao mesmo tempo, um verme quase sem movimento no caso de picadas de fio de platina foi considerado morto.

## 5.5 Atividade Antioxidante do OESG.

Três testes antioxidantes *in vitro* foram usados: capacidade antioxidante total, ensaio de sequestro do radical livre DPPH e poder redutor. Todos eles foram realizados conforme descrito por Presa e colaboradores (2017).

### 5.5.1. Determinação da capacidade antioxidante total (CAT)

Resumidamente, a solução (1 mL) contendo a amostra (OESG 100 µg/mL), molibdato de amônio (4 mM), fosfato de sódio (28 mM) e ácido sulfúrico (0,6 M) foram adicionados em um tubo, agitado e incubado (100 ° C, 90 min). Os tubos foram resfriados e lidos no comprimento de onda de 695 nm. O padrão utilizado foi o ácido ascórbico (AA) e os resultados foram expressos como AA equivalente por grama de amostra.

### 5.5.2. Poder Redutor

Um mililitro de amostra (OESG) em diferentes concentrações (0,05 – 1 mg / mL) foi misturado com fosfato padrão (0,2 M, pH 6,6) contendo ferricianeto de potássio (1%) e então incubado a 50 °C por 20 min. Em seguida, 10% de ácido tricloroacético (TCA) é adicionado à solução para interromper a reação. Cloreto férrico (0,1%) em água destilada foi adicionado à mistura, e a absorvância foi medida a 700 nm, conforme descrito por Presa et al. [28]. O AA é usado como padrão e os resultados foram expressos como porcentagem de atividade de 0,1 mg / mL de AA, que correspondeu a 100% de atividade.

### 5.5.3. DPPH

A porcentagem de atividade antioxidante (AA%) do OESG foi avaliada pelo ensaio de radical livre DPPH. A medição da atividade de eliminação do radical DPPH foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Brand-Williams et al. O OESG reagiu com o radical DPPH estável em solução de etanol. A mistura de reação consistiu na adição de 0,5 mL de amostra, 3 mL de etanol absoluto e 0,3 mL de solução de radical DPPH 0,5 mM em etanol. Quando o DPPH reage

com um composto antioxidante, que pode doar hidrogênio, ele é reduzido. As mudanças na cor (de violeta profundo para amarelo claro) foram lidas [Absorbância (Abs)] em 517 nm após 100 min de reação usando um espectrofotômetro UV-VIS (DU 800; Beckman Coulter, Fullerton, CA, EUA). A mistura de etanol (3,3 mL) e amostra (0,5 mL) serve como branco. A solução controle foi preparada pela mistura de etanol (3,5 mL) e solução de radical DPPH (0,3 mL). A porcentagem de atividade de eliminação (AA%) foi determinada de acordo com Mensor et al. (12):

$$AA\% = 100 - \left[ \frac{(Abs_{sample} - Abs_{blank}) \times 100}{Abs_{control}} \right]$$

### 5.6 Teste de resistência ao estresse oxidativo

Para avaliar a resistência ao estresse oxidativo, os animais do tipo selvagem N2 foram sincronizados em L1, em seguida tratados por 48 h a 20 °C até L4 em placas com NGM semeadas com *E.coli* OP50 viva contendo o OESG nas concentrações indicadas. Após 48 h, 30 animais em L4 foram transferidos para placas sem tratamento contendo NGM, FUDR (12 µg/mL) e hidroperóxido de terc-butilo (t-BOOH) (10 mM). Os experimentos foram realizados em placas de 30 mm com 30 animais por grupo (10 em cada placa) e as frações de sobrevivência foram pontuadas a cada seis horas em lupa estereoscópica (Motic-SMZ-161) até que todos os animais fossem considerados mortos, sem bombeamento ou movimento faríngeo (OLIVEIRA et al, 2009). Os experimentos foram realizados em Triplicata biológica.

### 5.7 Quantificação de ERO intracelular

A produção de ERO intracelular no modelo *C. elegans* foi medida usando a sonda fluorescente diacetato 2',7'-diclorodihidro-fluoresceína (H2DCF-DA), seguindo o protocolo descrito por Shi et al. (2012) com algumas modificações. Animais tipo selvagem N2 foram sincronizados em larvas de primeiro estágio tratadas ou não com 0.1, 0.25, 0.5 e 1 mg/mL de OESG diluído em meio de cultura OP50. Os experimentos foram realizados em condições padrão. Após os animais atingirem o estágio larval L4, as placas foram lavadas e os vermes transferidos para microtubos para a obtenção do homogenato por meio de sonicação utilizando um sonicador de ponteira com amplitude de 50%. Após a obtenção do homogenato de cada grupo tratado ou não

com o OESG foi realizada a quantificação de proteína. Logo em seguida, a placa escura de 96 micropoços foi preparada adicionando em cada micropoço M9, o homogenato e, sem exposição a luz, a sonda na concentração de 100 mM em seguida a placa foi incubada por um período de 30 minutos. As medições foram realizadas em um leitor de microplacas (GloMax®-Multi Detection System, Promega, Wisconsin, EUA), com excitação a 485 nm e emissão a 535 nm, e os valores médios foram calculados.

### **5.8 Inibição da Enzima Acetilcolinesterase em *C. elegans***

Para avaliar a inibição da enzima AChE em *C. elegans* foi determinado a atividade enzimática pelo método de Bradford (1976), adaptado por Sedmak e Grossberg (1977) com algumas modificações. Animais tipo selvagem N2 foram sincronizados em larvas de primeiro estágio tratadas ou não com 0.1, 0.25, 0.5 e 1 mg/mL de OESG diluído em meio de cultura OP50. Após os animais atingirem o estágio larval L4, as placas foram lavadas e os vermes transferidos para microtubos para a obtenção do homogenato por meio de sonicação utilizando um sonicador de ponteira com amplitude de 50%. Após a obtenção do homogenato de cada grupo tratado ou não com o OESG foi realizada a quantificação de proteína. Logo em seguida, a placa escura de 96 micropoços foi preparada adicionando em cada micropoço 10 uL de TRISHCl e 10 uL do homogenato (concentração da proteína de 250 µg/mL) em seguida a placa foi incubada por um período de 1 hora. Após o período de incubação foi adicionado a cada micropoço 200 µL de DTNB e, para o início da reação da atividade enzimática, 20 mL do substrato (acetiltiocolina 62 mM). As medições foram realizadas em um leitor de microplacas (GloMax®-Multi Detection System, Promega, Wisconsin, EUA), com excitação a 485 nm e emissão a 535 nm, e os valores médios foram calculados.

### **5.9. Ensaio de paralisia induzida por Aldicarb**

O experimento de paralisia induzida por Aldicarb foi realizada segundo a metodologia de Mahoney et al (2006) e Oh e Kim, (2017) com algumas adaptações. Após a sincronização em L1, os animais do tipo selvagem (N2) foram semeados em placas contendo OP50 *E. coli* (mas não contendo Aldicarb) a 20 ° C por 48 h até atingirem o estágio larval L4. Para a condição

experimental com Aldicarb foram separadas placas de cultivo celular de 24 poços de fundo chato, sendo que cada poço comporta entre 1 e 2 mL de meio NGM. O NGM devidamente suplementado com as soluções usuais (tampão fosfato de potássio (KPO<sub>4</sub>), MgSO<sub>4</sub>, CaCl<sub>2</sub>, colesterol e estreptomicina), além do Aldicarb, Neostigmina e OESG foi distribuído nas placas de experimento. Quando o meio NGM estava sólido, foram colocados 10 µL de OP50 em cada poço. Logo após as placas estarem prontas, foram transferidos 30 animais (10 em cada poço) para cada grupo tratado com Aldicarb (1 mM), Neostigmina (1 mM), OESG (0.1, 0.25, 0.5, 1 mg/mL). O experimento foi realizado em triplicata técnica e biológica e os animais foram observados a cada 1 hora. Os animais que não se moviam sem resposta a um toque áspero, foram removidos do poço e registrados.

### 5.10 Ensaio de paralisia induzida pelo peptídeo β-amiloide

Os ensaios de paralisia foram realizados com a cepa CL2006 que expressa o peptídeo β-amiloide humano (Aβ-42) no músculo de forma constitutiva e induz o verme a paralisia. Os animais foram semeados em placas de experimento preparadas com NGM e meio de cultura (OP50) contendo OESG nas concentrações indicadas por 48 h a 20 °C. Após esse período, 30 animais em estágio larval L4 foram transferidos para novas placas sem tratamento e colocados em um Shaker 35 °C para que o fenótipo de paralisia fosse acelerado. A paralisia foi pontuada em intervalos de 1 h por até 12 h. Os animais foram marcados como "paralisados" com base no fracasso em mover seu corpo por meio do estímulo com uma alça de platina, ou quando posicionados em forma de um halo indicando uma condição paralisada. O experimento foi realizado em triplicata biológica.

### 5.11 Análise estatística

Todos os dados obtidos foram submetidos ao programa estatístico *GraphPad Prism* versão 8.0 (EUA) para a construção dos gráficos e cálculos de valores p. Os dados foram avaliados quanto à sua normalidade (distribuição Gaussiana) através do teste de *Kolmogorov-Smirnov*. Para dados em distribuição normal, foram usados os testes *t* de *Student* para comparar os grupos. Dados não paramétricos foram analisados pelo teste de *Mann-Whitney* comparar grupos. As curvas de sobrevivência foram analisadas por teste de *log-rank* (*Mantel-Cox*). Para todos os testes, a significância foi determinada como  $p \leq 0.05$ .

## 6. Resultados e Discussão

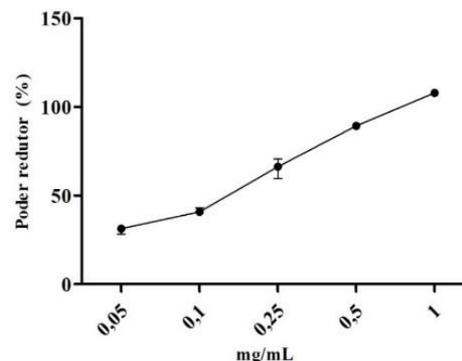
### 6.1 Determinação da capacidade antioxidante total (CAT)

A capacidade antioxidante total é um importante biomarcador do estresse oxidativo pois por meio deste ensaio pode-se determinar a sinergia envolvida entre os componentes da amostra analisada (Costa et al, 2017). Por meio do ensaio para definir a capacidade antioxidante total (CAT), foi determinada a capacidade dos compostos presentes no OESG de doar elétrons em meio ácido. Os resultados mostraram que 100 µg do OESG apresentou atividade com aproximadamente 379,16 mg de ácido ascórbico equivalente.

### 6.2 Poder Redutor

Por meio do ensaio de poder redutor, foi avaliada a capacidade dos compostos presentes no OESG de doar elétrons em um ambiente com pH próximo ao neutro. Verificou-se que o OESG (concentrações de 0.05 a 1 mg/mL) apresentou um poder redutor de quase 50% na concentração de 0,1 mg/mL e maior que 100% na concentração de 1 mg/mL (Figura 27). Muitos óleos essenciais apresentam atividade antioxidante devido aos inúmeros terpenóides presentes em sua composição química assim como foi relatado em um estudo realizado por Porto e colaboradores (2021) onde foi avaliada a atividade antioxidante do óleo essencial de tomilho pelo método FRAP e foi constatado seu poder redutor e presentes no óleo essencial foram caracterizados terpenóides como timol (53,3%), o carvacrol (8,9%) e p-cimeno (20,8%).

Figura 27 – Efeito do OESG sobre o poder redutor.

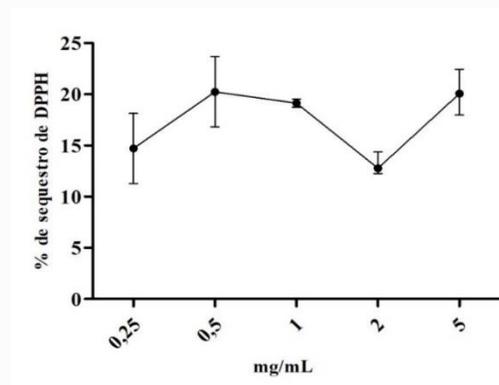


Legenda: Poder redutor de OESG. O ácido gálico (Gal Ac) foi usado nas quantidades correspondentes às concentrações de OESG usadas.

### 6.3 DPPH

O ensaio de DPPH foi empregado para avaliar a capacidade dos compostos presentes no OESG de sequestrar o radical este radical livre. Verificou-se que o OESG (concentrações de 0,25 a 5 mg/mL) apresentou capacidade de sequestro de 20% na concentração de 0,5 mg/mL (Figura 28). Em um trabalho realizado por Andrade et al (2013) foi avaliado a atividade antioxidante do OESG por meio do método de  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico e DPPH, porém em ambos os testes os resultados não foram satisfatórios. Entretanto, Soares et al (2017) produziu extratos (etanólico e metanólico) das folhas de *Siparuna guianensis* Aubl. e realizou o ensaio de DPPH para constatar a atividade antioxidante. Sugere-se que esta capacidade de sequestrar o radical e ser usado no combate ao estresse oxidativo ocorre devido a presença de compostos fenólicos, taninos e flavonoides nas folhas desta espécie. Diferente das substâncias encontradas no óleo essencial que em sua maioria são monoterpenos e sesquiterpenos como o  $\alpha$ -pineno (35.41%),  $\beta$ -pineno (17.81%), sabinene (12.01%) e sesquiterpeno biciclogermacreno (7.59%). Alguns destes compostos estão presentes no OESG deste estudo em questão, porém não é o suficiente para determinar o baixo resultado no teste de DPPH.

Figura 28 - Capacidade de sequestro do radical livre DPPH do OESG.



Strada e colaboradores (2010) isolaram o flavonoide Kaempferol 3,7-di-O- $\alpha$ -L-ramnopiranoside das folhas frescas da planta *Siparuna guianensis* Aubl. e analisaram tanto o extrato bruto quando a substância isolada e constataram sua atividade antioxidante por meio do

ensaio DPPH. Portanto, há presença compostos fenólicos, fenilpropanóides, flavonoides e terpenóides podem estar envolvidos na capacidade antioxidante tanto do óleo essencial quanto do extrato bruto das folhas frescas da planta aromática *Siparuna guianensis* Aubl.

#### 6.4 Inibição da OP50 pelo OESG

Para a leitura do ensaio de microdiluição foi utilizado o método colorimétrico, que consiste na adição de 20 µL da solução aquosa da matriz de resazurina na concentração de 0,01%, que é reconhecida como marcador colorimétrico de óxido- reação de redução (MANN; MARKAN, 1998; SALVAT et al, 2001; BURT; REINDERS, 2003). A mudança de coloração do molde (azul para rosa) indica crescimento microbiano. A menor concentração do óleo essencial capaz de inibir o crescimento da cepa testada, verificada para a coloração azul da matriz é considerada como medida da MIC (ESPINEL-INGROF et al, 1992). Os resultados apresentados na Tabela 8 demonstram que a cepa de OP50 foi inibida pelo OESG em todas as concentrações (0.015 a 1 mg/mL).

Tabela 8 - Determinação da Concentração Inibitória Mínima (MIC) do OESG contra *E. coli* OP50.

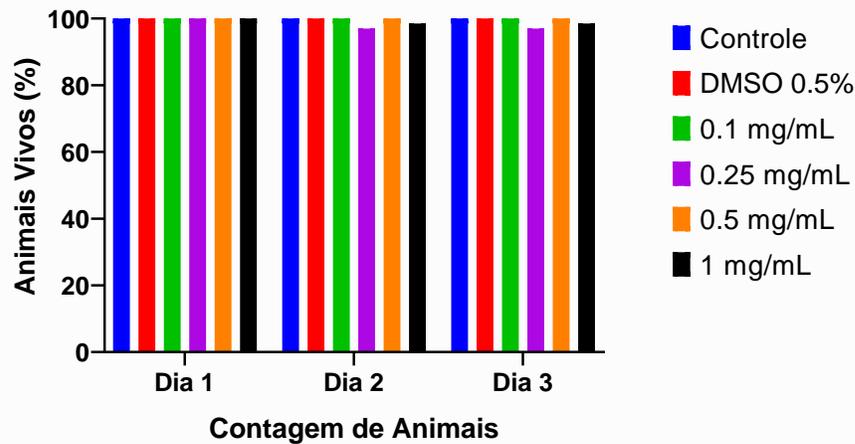
Bactéria	Controles		Concentrações do OESG (mg/mL)						
	Positivo	DMSO	1	0.5	0.25	0.125	0.06	0.03	0.01
<i>E. coli</i> OP50	+	+	-	-	-	-	-	+	+
	+	+	-	-	-	-	-	+	+

Legenda: - Ausência de crescimento e + Presença de crescimento.

#### 6.5 Ensaio de Sobrevivência

Os animais foram sincronizados no estágio larval L1 e posteriormente foram transferidos para placas com/sem tratamento. Após os animais atingirem o estágio larval L4 foram transferidos para placas sem tratamento para iniciar a contagem a cada 24 horas. Estatisticamente pode-se sugerir que a porcentagem dos animais dos grupos tratados com o OESG nas concentrações utilizadas (0.1, 0.25, 0.5 e 1 mg/mL) quando comparados ao grupo controle são semelhantes em todo o período do ensaio biológico ( $p > 0.05$ ). Os nematódeos avaliados por 3 dias que não respondiam a estímulos ou toques com a alça de platina eram considerados mortos.

Figura 29 – Efeito do OESG na sobrevivência em *C. elegans*.



**Legenda:** - Efeito do tratamento com OESG nas concentrações de 0.1, 0.25, 0.5 e 1.0 mg/mL, controle com OP50 e DMSO 0.5%, sobre a sobrevivência dos animais durante o período de 3 dias. Não houve diferença significativa entre o grupo controle e os grupos tratados ( $p > 0.05$ ) determinado pelo teste de Two-way ANOVA. Os ensaios foram realizados em triplicata biológica.

Após a realização da leitura por um período de 72 horas, os resultados encontrados na figura 29 mostraram que o OESG não teve efeito na vida útil dos nematoides. Desta forma, sugere-se que o OESG, nas concentrações utilizadas, não apresentou toxicidade aos vermes.

Diversos trabalhos encontrados na literatura avaliam a mortalidade do *C. elegans* causada pelo efeito dos óleos essenciais extraídos de plantas aromáticas (XIXI PIAO; SUN; YI, 2020). Chen e colaboradores (2020) avaliaram a atividade biológica do óleo essencial de *Acorus tatarinowii* Schott em um modelo de Alzheimer envolvendo a proteína b-amilóide utilizando o *C. elegans* e por meio do ensaio de sobrevivência constataram que o óleo não era tóxico aos animais. Do mesmo modo ocorreu no estudo realizado por Ganesh e Rai (2020) onde eles avaliaram a atividade bactericida do óleo essencial de *Murraya koenigii* utilizando o *C. elegans* não havendo efeito danoso aos vermes. Porém, na pesquisa realizada por Piao e colaboradores (2020), foi avaliada a atividade biológica do óleo essencial de cidra (*Citrus medica* cv. sarcodactylis) em modelo *C. elegans* e foi constatada por meio do valor de LD50 (1,48 mg/ml) uma alta mortalidade dos nematódeos caracterizando um efeito nematicida podendo ser atribuída aos terpenos d-limoneno e  $\beta$ -pineno encontrados em sua composição química.

Desta forma, óleos essenciais podem exibir efeitos benéficos e terapêuticos ao *C. elegans* bem como agir de forma tóxica e causando um efeito nematicida devido a variação da composição

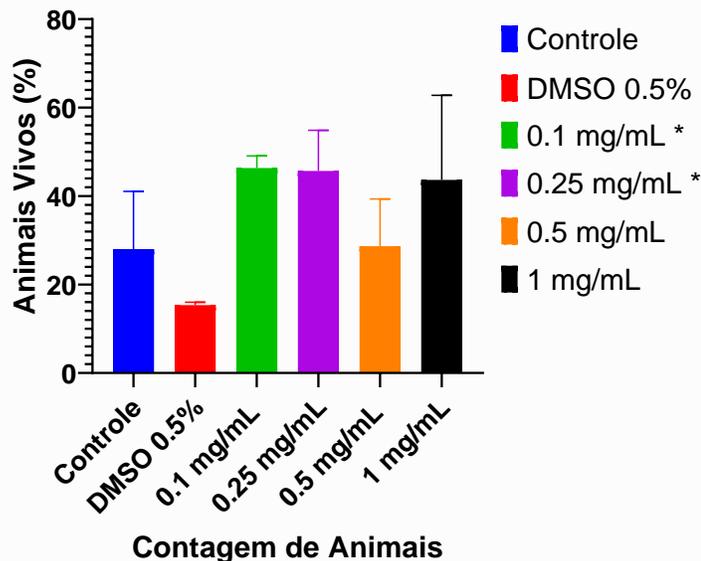
química de cada planta aromática segundo as condições as quais são encontradas no meio ambiente (FUENTES et al, 2022).

#### 6.4. Ensaio de resistência ao estresse oxidativo

Para avaliar a atividade antioxidante do OESG foi utilizado o modelo *in vivo* utilizando o *C. elegans* por meio do estresse oxidativo causado pelo agente estressor *t*-BOOH. Os animais foram tratados por um período de 48 horas em placas com o OESG nas concentrações de 0.1, 0.25, 0.5 e 1 mg/mL além do grupo sem tratamento e o grupo DMSO 0,5%. A figura 30 mostra a fração de sobreviventes após 0, 12, 18 e 24 horas expostos ao *t*-BOOH na concentração de 10 mM.

Foi observado que após 24 horas do início do estresse, a fração sobrevivente de animais tratados com 0.1 e 0.25 mg/mL de OESG promoveu um aumento na taxa de sobrevivência dos animais e foram significativos em comparação com animais tratados com DMSO 0.5% ( $p \leq 0,05$ ). Entretanto, a sobrevivência dos animais tratados com 1 mg/mL de OESG foi aparentemente maior em relação aos animais tratados com DMSO 0.5%, porém não foram significativos. Estes resultados sugerem um possível efeito dose-reposta do tratamento dos animais nas concentrações de 0.1 e 0.25 mg/mL de OESG, porém, o tratamento dos animais com 0.5 mg/mL não mostrou efeito protetor, uma vez que a fração de sobreviventes destes foram semelhantes ao grupo tratado com DMSO 0.5%.

Figura 30 – Efeito do OESG sobre a resistência ao estresse oxidativo em *C. elegans*.



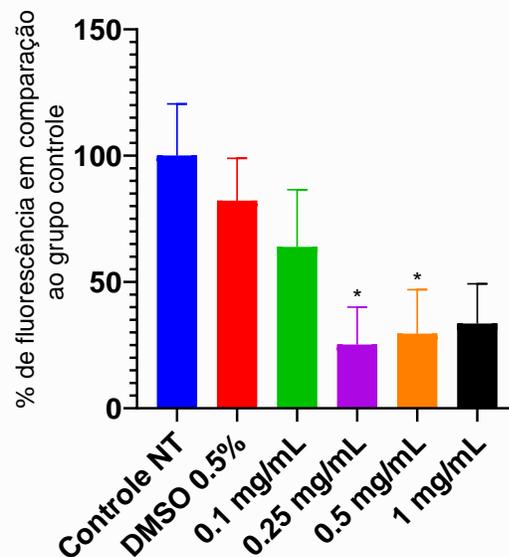
Legenda - Efeito do tratamento com OESG nas concentrações de 0,1, 0,25, 0,5 e 1.0 mg/mL, controle com OP50 e DMSO 0.5%, sobre a sobrevivência dos animais tipo selvagem submetidos às condições normais e de estresse oxidativo induzido por hidroperóxido de terc-butilo (t-BOOH) 10 mM por 24 horas. A barra de erros representa os valores  $\pm$  SEM. O símbolo \* representa o resultado significativo em comparação com o DMSO (0.5%) determinados pelo Ordinary one- way ANOVA ( $p < 0,05$ ).

Neste trabalho podemos ver que o OESG demonstrou grande capacidade antioxidante *in vitro* de acordo com os resultados da capacidade antioxidante total (CAT), poder redutor e a capacidade de neutralizar o radical DPPH. Desta forma, pode-se sugerir que os resultados *in vivo* e *in vitro* corroboram para a atividade antioxidante do OESG.

### 6.5. Efeito do tratamento com o OESG no acúmulo de ERO intracelular

O presente estudo teve como objetivo investigar a atividade antioxidante do OESG por meio da redução de espécies reativas de oxigênio no modelo *C. elegans* e conseqüentemente o efeito sobre a sobrevivência dos animais em condições normais. A figura 31 mostra os resultados obtidos por meio do tratamento com diferentes concentrações do OESG (0.1, 0.25, 0.5 e 1 mg/mL) foram capazes de reduzir significativamente os níveis de EROs quando comparadas ao grupo DMSO 0.5% ( $p < 0.05$ ).

Figura 31 - Quantificação de Espécies reativas de oxigênio intracelular (ERO's) no modelo *C. elegans*.



Legenda: Efeito do OESG sobre a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO's) intracelular no modelo *C. elegans*. Cada grupo foi tratado nas concentrações de 0.1, 0.25, 0.5 e 1 mg/mL além dos grupos controle com OP50 e DMSO 0.5%. A quantificação de fluorescência emitida pela sonda H<sub>2</sub>DCFDA foi medida utilizando o sistema de

detecção GloboMax®-mult (Promega, Madison, WI, EUA), com excitação em 485 nm e emissão em 510-570 nm. Os resultados foram significativos quando comparados ao grupo DMSO 0,5% representados pela média  $\pm$  SEM com valor  $*p=0,0290$  de forma geral, para as concentrações 0.25 e 0.5 mg/mL os valores de p foram 0.0282 e 0.0416. A análise estatística foi determinada pelo modelo Ordinary one-way ANOVA.

O efeito antioxidante dos óleos essenciais é extremamente importante para a manutenção de organismos vivos devido a sua composição química. Muitos compostos presentes nos óleos essenciais podem agir de forma benéfica combatendo processos nocivos causados pelo estresse oxidativo de radicais livres e espécies reativas de oxigênio cujo acúmulo acarreta processos neurodegenerativos e envelhecimento (SINGH et al, 2019). Além disso, a nanotecnologia oferece inúmeras vantagens para potencializar a eficácia das propriedades terapêuticas dos óleos essenciais, como por exemplo, aprimorar a solubilidade desses óleos em meio aquoso bem como melhorar a estabilidade de ativos sensíveis que podem estar presentes em sua composição química.

No presente estudo foi investigado as propriedades antioxidantes *in vivo* do por meio do modelo utilizando o *C. elegans*. A composição química do OESG possui terpenóides e fenilpropanóides como componentes majoritários (iso-shyobunona, epi-shyobunona, t-muurolol e a-muuroleno) que podem estar relacionados com a propriedade antioxidante como mostra alguns trabalhos encontrados na literatura. Ivanović e colaboradores (2021) analisaram a atividade antioxidante dos óleos essenciais de algumas espécies da família do gengibre (Zingiberaceae) *Elettaria cardamomum* L. Maton (cardamomo), *Curcuma Longa* L. (cúrcuma), *Zingiber Officinale* Roscoe (gengibre) e *Alpinia Officinarum*Hance (galanga) e comprovaram suas propriedades antioxidantes devido aos terpenóides presentes em sua composição química.

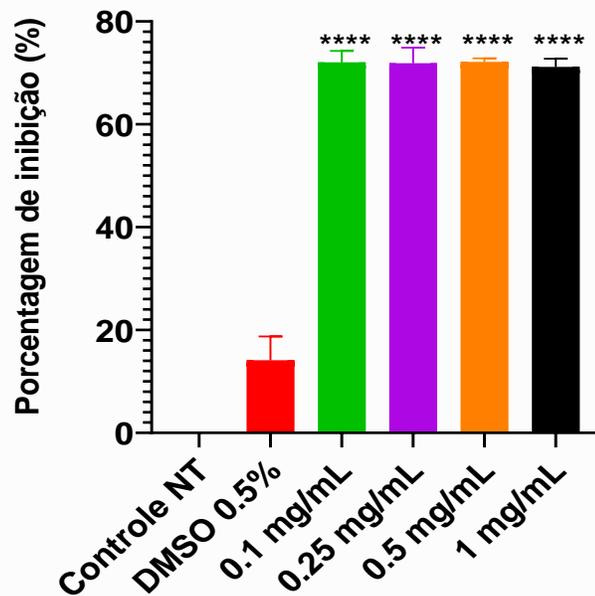
### **6.5. Ensaio de inibição da AChE em *C. elegans***

O modelo experimental *in vivo* utilizando o nematódeo *C. elegans* é bastante promissor quando utilizado para investigar as propriedades terapêuticas de substâncias e realizar sua triagem (ALEXANDER et al, 2014). Cerca de 80% dos genes encontrados no *C. elegans* são semelhantes aos genes humanos e seu sistema nervoso é bem definido e geneticamente tratável, oferecendo um modelo eficaz para explorar vias mecanicistas básicas que podem estar envolvidas no desenvolvimento e evolução de doenças neurodegenerativas (MA et al, 2018). Além disso, o sistema nervoso do *C. elegans* possuem muitos neurotransmissores como a ACh que viabiliza o

estudo da interação entre substâncias como óleos essenciais e a enzima AChE levando a sua inibição em um modelo *in vivo* (LIANG et al, 2020).

Neste trabalho foi demonstrado a capacidade do OESG inibir a enzima AChE por meio de ensaios *in vitro* e *in silico*, além de elucidar os mecanismos de interação das substâncias presentes no óleo essencial e a enzima AChE (MARTINS et al, 2021). Portanto, foi utilizado o ensaio *in vivo* utilizando o homogenato de *C. elegans* tratado com o OESG para avaliar sua atividade anticolinesterásica. A figura 32 mostra que após o tratamento dos animais com o OESG e a preparação do homogenato para os testes, todas as concentrações (0.1, 0.25, 0.5 e 1 mg/mL) apresentaram porcentagem de inibição significativas quando comparadas ao grupo tratado com DMSO 0.5% ( $p < 0.05$ ), com percentual de até 72.3% de inibição.

Figura 32 – Efeito das OESG sobre a AChE do homogenato do *C. elegans* em porcentagem



Legenda – Resultados de ensaio de inibição da AChE em animais do tipo selvagem (WT). O homogenato dos animais tratados ou não com diferentes concentrações do OESG e DMSO 0.5% foram quantificados, colocados em placas e mensurados em leitor de microplacas a 405nm após um período de incubação de 1 hora. Os dados estatísticos sugerem que os resultados foram significativos quando comparados ao grupo DMSO 0.5%, representados pela média  $\pm$  SEM e valor de \*\*\*\* $p < 0,0001$  determinados pelo teste Ordinary one-way ANOVA.

Li et al (2020) focou seu trabalho na atividade inibitória de flavonóides oriundos da planta *Eupatorium adenophorum* frente a AChE utilizando o homogenato de *C. elegans*. De acordo com os resultados, os compostos químicos presentes no óleo essencial da espécie interagiram significativamente com a enzima e a hidroxilação potencializou a interação. Portanto, o estudo em

questão tentou validar a *E. adenophorum* como fonte de inibidores da AChE sugerindo que estes compostos podem ser úteis para a descoberta de novos inibidores da AChE.

#### **6.6. Ensaio de paralisia induzida por Aldicarb para determinar defeitos na transmissão sináptica em *Caenorhabditis elegans***

O Aldicarb é uma substância bastante utilizada como pesticida e nematicida, agindo como um inibidor da AChE e preventor da hidrólise do neurotransmissor acetilcolina nas fendas sinápticas (Izquierdo et al, 2021). Esta reação de interação causa o acúmulo de ACh nas fendas sinápticas causando uma superativação dos receptores musculares de ACh o que por sua vez leva a contração dos músculos e, conseqüentemente, os vermes ficam paralisados ao longo do tempo. O tempo necessário para que os animais fiquem paralisados por Aldicarb depende da capacidade de transmissão dos neurônios e a ACh, ou seja, ocorre de acordo com a secreção de ACh na fenda sináptica (OH; KIM, 2017; REFAI; BLAKELY, 2017).

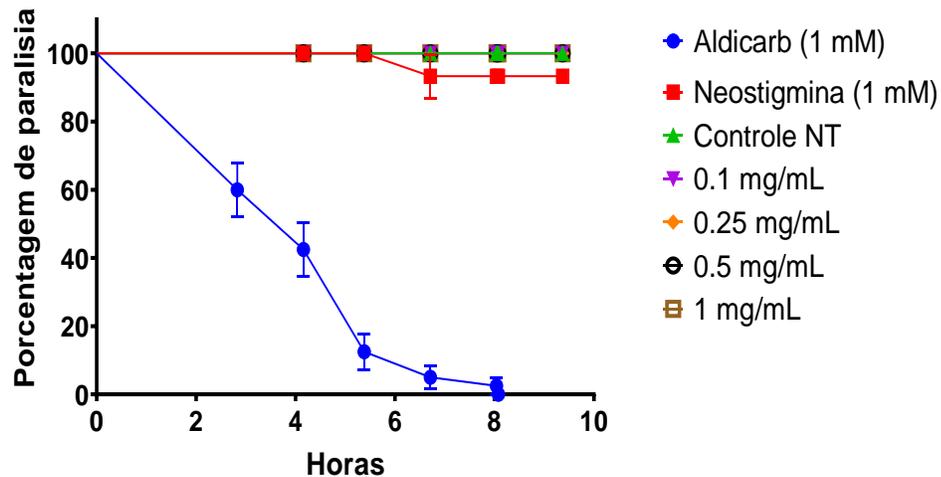
Os animais foram sincronizados no estágio larval L1 e posteriormente foram transferidos para placas de 60 mm sem tratamento. Após os animais atingirem o estágio larval L4 foram para as placas de 20 poços contendo 10 animais por poço para cada tratamento. Analisando a figura 33, após o período de 1 hora os vermes tratados com Aldicarb começaram a paralisar, porém os vermes tratados com Neostigmina e as diferentes concentrações do OESG não paralisaram obtendo resultados estatisticamente significativos quando comparados ao grupo tratado com Aldicarb ( $p < 0.0001$ ).

O Aldicarb é um pesticida e nematicida potencialmente inibidor da AChE e segundo Rice e colaboradores (2020) seu mecanismo de inibição é reversível. Tal característica indica que o Aldicarb interage com os sítios ativos da enzima e estabelece uma ligação não-covalente (instável) com a AChE de tal forma que a enzima pode retomar sua atividade quando o inibidor for dissociado, em consequência desta interação há um aumento na concentração de acetilcolina na fenda sináptica levando o verme a paralisia. A Neostigmina é um medicamento padrão utilizado no tratamento do Alzheimer devido a suas propriedades terapêuticas ligadas aos déficits de produção de ACh em mamíferos e seu mecanismo de interação com a AChE também é reversível (ELDUFANI; BLAISE, 2019; PULLAGURI; KAGOO; BHARGAVA, 2022). Porém, em um trabalho realizado por Kalinnikova et al (2013), após a investigação sobre a baixa concentração de

ACh em *C. elegans* devido ao estresse térmico, foi relatado que para a Neostigmina obtivesse um efeito tóxico (paralisante) semelhante ao Aldicarb seria necessário realizar o experimento utilizando uma concentração mais elevada (igual ou maior que 6 mM) a uma temperatura de 22°. Entretanto, em concentrações mais baixas (0,1-0,7 mM) a Neostigmina causou aumento no comportamento de termotolerância revelando um aumento do tempo médio da capacidade dos vermes de manter um comportamento coordenado (natação, induzida por estímulo mecânico) a uma temperatura constante de 36 °C.

O envolvimento da ACh na locomoção do *C. elegans* inclui não apenas a transmissão neuromuscular, mas também a transmissão neurônio-neurônio. Portanto, o aumento da termotolerância do comportamento de *C. elegans* causado pela inibição da AChE pode ser uma consequência da superativação dos receptores nicotínicos (nAChRs) e receptores metabotrópicos de acetilcolina muscarínicos (mAChRs), uma vez que o estresse térmico causa a diminuição na produção de ACh levando a hipercontração dos músculos que afeta sua locomoção, alimentação e bombeamento faríngeo (KALINNIKOVA et al 2013).

Figura 33 - Efeito do tratamento com OESG sobre o fenótipo de paralisia induzida por Aldicarb



Legenda – Resultados de ensaio de Aldicarb em animais do tipo selvagem (WT). Os animais foram semeados em placas com Aldicarb, Neostigmina (1mM) e diferentes concentrações do OESG (0.1, 0.25, 0.5 e 1 mg/mL). Os resultados foram significativos, representados pela média  $\pm$  SEM e valor de \*\*\*\*p <0,0001 para todos os grupos tratados com Neostigmina (1mM) e diferentes concentrações do OESG (0.1, 0.25, 0.5 e 1 mg/mL) quando comparados ao Aldicarb, determinados pelo teste Log Rank (Mantel-Cox).

O inibidor reversível da AChE, a Neostigmina, é comumente usada na medicina para tratar distúrbios relacionados a baixa produção de ACh e estudos neurofisiológicos em mamíferos (LUO et al, 2018). Segundo Egorova et al (2021) o efeito tóxico do Aldicarb no *C. elegans* é aumentado pela ação dos neurotransmissores octopamina e dopamina na locomoção dos nematóides e que para a Neostigmina exibir efeito tóxico semelhante ao Aldicarb seria necessário utilizar uma concentração 60 vezes, pois os efeitos terapêuticos dos inibidores da AChE são mostrados apenas nos estados de deficiência de ACh do sistema colinérgico.

Neste trabalho por meios dos ensaios *in vitro* e *in vivo*, foi relatado que o mecanismo de interação entre o OESG e a enzima AChE também é reversível (MARTINS et al, 2021). Desta forma, sugere-se que o OESG deve ser utilizado em concentrações mais altas para exibirem toxicidade e conseqüentemente paralisia semelhante ao Aldicarb, uma vez que as concentrações utilizadas obtiveram efeito semelhante a Neostigmina, ou seja, não paralisaram os animais e não apresentaram sinais de baixas nas taxas de sobrevivência dos vermes exibindo um possível efeito terapêutico.

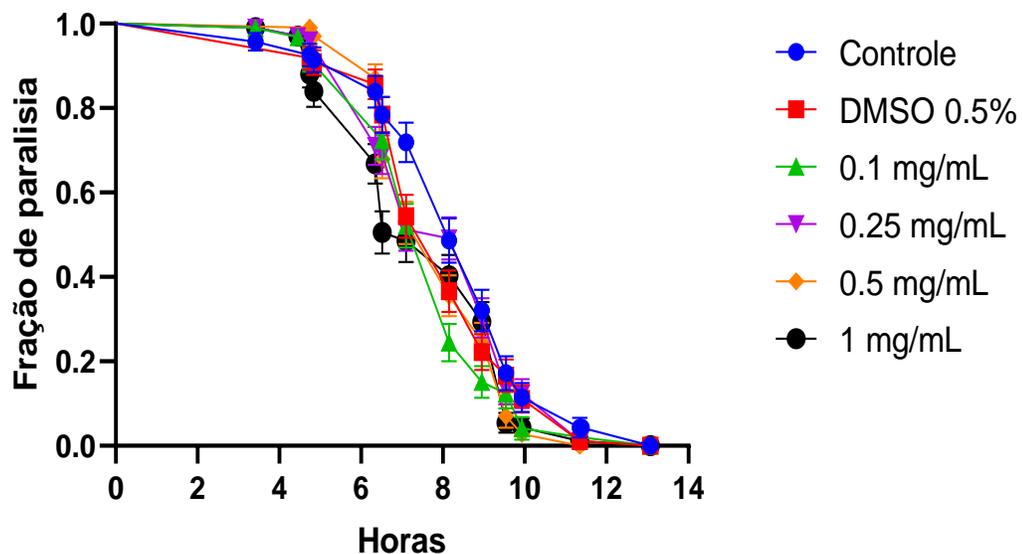
#### **6.6. Ensaio de paralisia induzida por acúmulo da $\beta$ -amilóide em *Caenorhabditis elegans***

A deposição extracelular do fragmento de proteína  $\beta$ -amilóide acarreta a formação de placas senis, disfunção sináptica e neurodegeneração dos neurônios, sendo uma das principais hipóteses sobre o surgimento do Alzheimer em pessoas idosas (LONG; HOLTZMAN, 2019). O nematódeo *C. elegans* é um ótimo modelo *in vivo* para avaliar e realizar a triagem de substâncias ativas oriundas de produtos naturais capazes de impedir, proteger ou diminuir a produção e acúmulo de proteínas humanas que tendem a se agregar ( $\beta$ -amilóide) de forma constitutiva nos músculos ou neurônios do verme. Desta forma, foi avaliada a eficácia do OESG em retardar a paralisia induzida por A $\beta$  em vermes transgênicos CL2006 que expressam a proteína A $\beta$  humana da forma constitutiva a qual é direcionada para as células musculares levando o verme ao fenótipo de paralisia que é acelerada quando os vermes são mantidos a 35° C. Os vermes foram tratados com diferentes concentrações do OESG (0.1, 0.25, 0.5 e 1 mg/mL) em placas de petri de 60 mm 20°C por 3 d. A figura 34 mostra que o OESG não conseguiu impedir a paralisia dos vermes, sendo que os grupos tratados com as diferentes concentrações do óleo obtiveram resultados estatisticamente não significativos quando comparados ao grupo tratado com DMSO 0,5%. Desta

forma, pode-se dizer que o OESG não protege os animais da cepa CL 2006 contra o estresse proteotóxico.

No trabalho realizado por Zhu et al (2021) foi relatado que o óleo essencial de rosa (REO) foi capaz de atrasar significativa o fenótipo de paralisia da cepa transgênica do animal *C. elegans* (CL 4176) que expressa a A $\beta$ 1-42 humana de forma músculo-específica. Os componentes majoritários do REO são o  $\beta$ -citronelol e geraniol (54,01% e 15,02%) também foram avaliados a fim de verificar a atividade desses compostos de forma isolada em relação aos efeitos causados pela b-amilóide no *C. elegans*, porém não foi observado o mesmo efeito, sugerindo que a atividade do REO pode ocorrer em sinergismo dos compostos presentes na composição química. Wang et al (2022) avaliou a capacidade do triterpenóide ácido ursólico de evitar o estresse proteotóxico em um modelo de Alzheimer utilizando a cepa CL 4176 do nematódeo *C. elegans* que expressa a  $\beta$ -amilóide de forma constitutiva no músculo sugerindo seu efeito terapêutico por meio do aumento da atividade do proteossoma *in vivo*.

Figura 34 - Efeito do tratamento com o OESG na paralisia induzida por  $\beta$ -amilóide em modelos transgênicos de *C. elegans* da doença de Alzheimer.



Legenda - Curvas de paralisia para cepas de *C. elegans* expressando  $\beta$ -amilóide muscular de forma constitutiva (CL2006) tratadas com (0.1, 0.25, 0.5 e 1 mg/mL) de OESG de L1 até L4. Para acelerar a paralisia, os vermes CL2006 foram transferidos para 35°C. A paralisia foi verificada em intervalos de 1 h a 35°C. As cepas tratadas não mostraram progressão retardada da paralisia corporal em comparação com vermes do grupo DMSO 0.5%. Resultados não significativos ( $p > 0.05$ ) de acordo com o teste log-rank (Mantel-Cox).

Boasquíviz et al (2018) avaliou a ação neuroprotetora do extrato de guaraná (GHE) em modelos de doenças neurodegenerativas para as doenças de Alzheimer e Huntington. Foi verificado que o efeito protetor do GHE estava associado à atividade antioxidante e modulação da protease pois houve o aumento do tempo de vida e a atividade do proteassoma. Além disso, as espécies reativas de oxigênio intracelular e o acúmulo de autofagossomos foram reduzidos bem como o aumento da expressão de SOD-3 e HSP-16.2. Desta forma, o GHE tem potencial terapêutico no combate a doenças neurodegenerativas, uma vez que foi capaz de diminuir a produção de proteínas mau formadas como a  $\beta$ -amilóide e a poliglutamina (poliQ) no músculo do verme, sugerindo um grande potencial neuroprotetor a substâncias oriundas de produtos naturais.

### **Capítulo 3 – Produção de nanocápsulas poliméricas biodegradáveis contendo óleo essencial de *Siparuna guianensis* Aubl. e avaliação protetora em modelos de *Caenorhabditis elegans*.**

## **7. METODOLOGIA**

### **7.1 Produção das nanocápsulas contendo OESG**

As nanocápsulas serão elaboradas segundo o método de polimerização interfacial (Souto et al, 2012). 0,1 mL de óleo essencial de *Siparuna guianensis* Aubl., 60 mg de poli (L-ácido láctico-co-ácido glicólico) (PLGA) e 25 mg de Epikuron 200 serão solubilizados em 6 mL de acetona para produzir a fase orgânica. Esta fase será injetada lentamente gota a gota em 12 mL de solução de polisorbato 80 (1 %). Esta dispersão será homogeneizada durante 20 minutos por agitação magnética a 300 rpm à temperatura ambiente. A dispersão coloidal obtida será concentrada por evaporador rotativo à 38°C. As nanocápsulas serão purificadas e concentradas por filtração tangencial.

### **7.2 Otimização da produção de nanocápsulas contendo OESG**

Um planejamento experimental de três fatores e três níveis tipo Box-Behnken será empregado. As concentrações de PLGA (50 a 250mg), óleo essencial de *Siparuna guianensis* Aubl. (100 a 300 mg) e polisorbato 80 (50 a 250 mg) serão codificadas e usadas como variáveis independentes. A produção das nanocápsulas será desenvolvida conforme descrito no item 3.6.1 com modificação segundo o planejamento experimental aleatorizado tipo Box-Behnken. As variáveis dependentes escolhidas serão: tamanho da partícula, índice de polidispersão, potencial zeta e quantidade de óleo encapsulado. A otimização será realizada pela construção de gráficos 3D de superfície de resposta. As análises serão realizadas utilizando o software Statistica 7.

### **7.3. Produção e otimização da produção de nanocápsulas contendo o OESG revestidas com quitosana.**

As nanocápsulas serão elaboradas segundo o método de polimerização interfacial (Souto et al, 2012). Onde 70 mg de óleo essencial de *Siparuna guianensis* Aubl., 60 mg de poli (L-ácido láctico-co-ácido glicólico) (PLGA) e 25 mg de Epikuron 200 serão solubilizados em 6 mL de acetona para produzir a fase orgânica. Esta fase será injetada lentamente gota a gota em 12 mL de solução de polisorbato 80 (1 %) e quitosana a 0.02%. Esta dispersão será homogeneizada durante 20 minutos por agitação magnética a 300 rpm à temperatura ambiente. A dispersão coloidal obtida será concentrada por evaporador rotativo à 40°C. As nanocápsulas serão purificadas e concentradas por filtração tangencial.

### **7.4 Nanocápsulas contendo vermelho de Nilo**

As nanocápsulas contendo o OESG marcadas com Nile red foram preparados segundo o item 5.1 modificado pela diluição de Nile red em 100 µL de OESG (10 mg/mL) na fase orgânica.

### **7.5 Caracterização das nanocápsulas**

O diâmetro hidrodinâmico, a distribuição do tamanho e o potencial zeta das nanocápsulas serão determinados usando Zetasizer Nano ZS90 (Malvern Instruments Ltd, Worcestershire, RU) a 25 °C. As amostras serão diluídas a uma razão de 1:100.

### **7.6 Morfologia das nanocápsulas**

As observações serão realizadas utilizando um microscópio eletrônico de transmissão JEOL 1400, acoplado com uma câmera digital Gatan de alta resolução (Orius SC1000) e operado a 80kV. Nanocápsulas serão depositadas numa grelha com revestimento de carbono durante 5 minutos. Posteriormente, as nanocápsulas não fixadas serão removidos, e uma gota de ácido fosfotungstíco a 2% (pH 7,4) será adicionado a grelha por 30 segundos, secada e analisada.

### 7.7 Estabilidade das nanocápsulas

A estabilidade das nanocápsulas foi analisada durante um período de sessenta dias, realizando o monitoramento do tamanho hidrodinâmico, índice de polidispersão e potencial Zeta das amostras que foram armazenadas a 4 °C. O monitoramento foi realizado por meio da caracterização físico-química utilizando um analisador de partículas e as leituras foram realizadas nos dias 1, 5, 10, 15, 30 e 60 após a preparação de cada formulação.

### 7.8 Atividade protetora das NCSG em modelos de *C. elegans*

Os ensaios realizados para avaliar a atividade protetora das NCSG em modelos de *C. elegans* seguiram os mesmos protocolos utilizados com OESG e nas mesmas concentrações, de acordo os itens descritos na seção de metodologia encontrada no capítulo 2:

- 5.6 Teste de resistência ao estresse oxidativo
- 5.7 Quantificação de ERO intracelular
- 5.8 Inibição da Enzima Acetilcolinesterase em *C. elegans*
- 5.9. Ensaio de paralisia induzida por Aldicarb
- 5.10 Ensaio de paralisia induzida pelo peptídeo  $\beta$ -amiloide

### 7.7 Análises Estatísticas

Todos os experimentos serão realizados em triplicata e os dados obtidos serão expressos como média  $\pm$  desvio padrão. As médias entre os diferentes tratamentos serão comparadas pelo Teste-*t* de Student, enquanto para os resultados entre grupos serão estudados através da análise de variância (ANOVA). Os dados obtidos serão analisados através do GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, E.U.A.). Valores de  $p$  menores que 0,05 serão considerados estatisticamente significativos.

## 8 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 8.1 Produção e otimização da produção de nanocápsulas contendo o óleo essencial de *Siparuna guianensis* Aubl.

Este trabalho teve como objetivo identificar as condições ideais para o encapsulamento do óleo essencial de OESG em nanocápsulas pelo método de polimerização interfacial de utilizando o polímero pré-formado poli (L-ácido láctico-co-ácido glicólico) (PLGA) (FESSI et al, 1989; SCHAFFAZICK et al, 2003). As concentrações do OESG, PLGA e polisorbato 80% (surfactante) variaram de acordo com o planejamento experimental, onde 25 mg de Epikuron 200 foram solubilizados em 6 mL de acetona para produzir a fase orgânica. Esta fase foi injetada lentamente, gota a gota, em 12 mL de solução de polisorbato 80 (1%). Esta dispersão foi homogeneizada durante 20 minutos em agitação magnética a 300 rpm em temperatura ambiente. As dispersões coloidais obtidas foram concentradas utilizando um evaporador rotativo à 40°C.

O planejamento experimental de três fatores e três níveis do tipo Box-Behnken foi empregado com o objetivo de identificar quais seriam as melhores condições e concentrações das variáveis escolhidas para preparar a formulação adequada das nanocápsulas poliméricas biodegradáveis contendo OESG conforme mostra a Tabela 9.

Tabela 9 - Planejamento experimental para produção de nanocápsulas contendo o óleo essencial de *Siparuna guianensis*

Fatores	Níveis usados		
	Baixo (-1)	Médio (0)	Alto (+1)
Concentração de Polímero (PLGA) (mg)	10	60	110
Concentração de óleo de Siparuna (mg)	50	125	200
Tween 80 (mg)	10	40	70
Respostas			
Tamanho de partícula (R1)	Mínima		
PDI (R2)	Mínima		
Potencial Zeta (R3)	Máxima		

Legenda: \*R1: resposta 1, R2: resposta 2, R3: resposta 3.

As concentrações do polímero pré-formado PLGA (10 a 110mg), OESG (50 a 200mg) e polisorbato 80 (10 a 70mg) foram codificadas e usadas como variáveis independentes. A produção das nanocápsulas foi desenvolvida conforme descrito anteriormente e as variáveis dependentes

escolhidas foram: tamanho da partícula, índice de polidispersão, potencial Zeta e quantidade de óleo encapsulado. A otimização das nanocápsulas foi realizada por meio da construção de gráficos 3D de superfície de resposta e as análises foram performadas utilizando o software Statistica 7.

As variáveis independentes do planejamento experimental do tipo Box Benken geraram 11 formulações conforme mostra a Figura 35. Considerando os aspectos visuais, todas as formulações obtidas apresentaram opalescência característica de dispersões coloidais de um nanossistema polimérico, exceto a formulação 2 que, além de resíduos aparentes após sua preparação, apresentou uma coloração mais clara diferente do esperado, indicando que não houve sucesso na nanoencapsulação do óleo.

Figura 35 - Nanocápsulas poliméricas contendo o OESG produzidas por meio do planejamento experimental



Fonte: O autor.

As formulações produzidas geraram nanocápsulas de diferentes tamanhos e carga superficial, as quais foram caracterizadas por meio da técnica de espalhamento de luz utilizando um analisador de partículas ZetaSizer Malvern.

## 8.2 Caracterização das nanocápsulas

### 8.2.1 Análise do tamanho de partícula e potencial Zeta

O diâmetro hidrodinâmico, a distribuição do tamanho e o potencial zeta das nanocápsulas foram determinados utilizando um analisador de partículas Zetasizer Nano ZS90 (Malvern Instruments Ltd, Worcestershire, RU) a 25 °C. As análises físico-químicas das 11 formulações geradas por meio do planejamento experimental estão sumarizadas na Tabela 10:

Tabela 10 – Caracterização físico-química das dispersões coloidais geradas no planejamento experimental

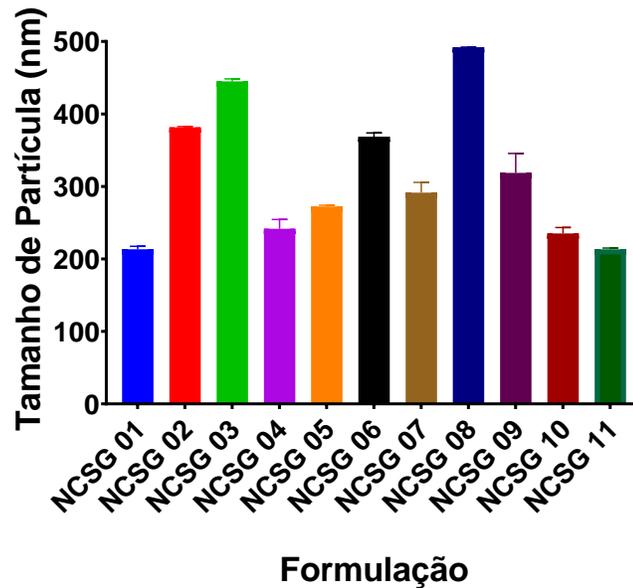
Formulações	PLGA (mg)	OESG (mg)	Tween 80 (mg)	Tamanho (média ± DP)	PDI (média ± DP)	Potencial Zeta (média ± DP)
NcSg – 01	10	50	10	213,3±4,1	0,117±0,03	7,25±0,87
NcSg – 02	110	50	10	381,5±1,05	0,2±0,01	9,12±0,76
NcSg – 03	60	125	40	445,0±3,45	0,329±0,04	9,50±0,86
NcSg – 04	110	200	10	241,6±12,8	0,220±0,09	9,34±0,68
NcSg – 05	10	50	70	272,3±1,7	0,121±0,02	8,76±0,66
NcSg – 06	60	125	40	368,8±4,99	0,18±0,03	10,0±0,17
NcSg – 07	10	200	70	291,5±14,07	0,290±0,05	9,82±0,32
NcSg – 08	60	125	40	492,0±0,28	0,142±0,11	8,34±0,24
NcSg – 09	110	200	70	318,8±26,66	0,204±0,09	9,68±0,22
NcSg – 10	10	200	10	235,2±8,12	0,302±0,09	9,45±0,36
NcSg – 11	110	50	70	213,3±1,7	0,147±0,01	14,3±0,21

Legenda: \*NcSg – Nanocápsulas poliméricas biodegradáveis contendo o óleo de *Siparuna guianensis* Aubl.

O tamanho das nanopartículas produzidas variou de 213±1,7 nm a 492 ± 0,28 nm quando preparadas com óleo essencial de *Siparuna guianensis* Aubl. e o índice de polidispersividade apresentou um resultado de no máximo 0,329±0,041 indicando que todas as formulações produzidas possuem em sua grande maioria nanocápsulas de mesmo diâmetro. Ainda em relação ao tamanho das nanocápsulas pode se observar que a formulação 01 e 11 obtiveram os menores resultados (213 nm) indicando que ao se utilizar uma maior quantidade de polímero também deve-se aumentar a quantidade de surfactante.

Analisando os resultados obtidos em relação ao potencial Zeta das nanocápsulas de OESG, todas foram caracterizadas por valores negativos, os resultados variaram de 8,76±0,66 a 14,3±0,208 mV.

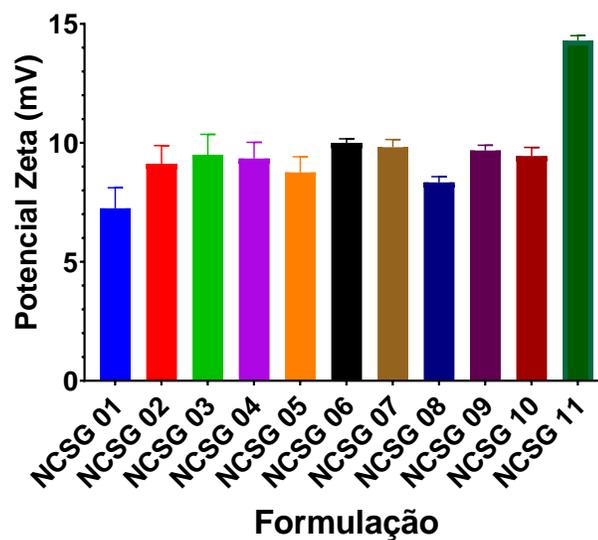
Fig. 36 - Tamanho de partícula das NCSG produzidas no Planejamento Experimental



Legenda: Distribuição do tamanho de partículas das NCSG produzidas no planejamento experimental. Os resultados mostram que a NCSG 01 possui diferença significativa em relação as demais formulações  $p < 0.0001$ . O teste anova one way foi aplicado.

De acordo com o gráfico representado pela figura 36 a formulação NCSG 01 possui o menor diâmetro tendo diferença significativa em relação as demais amostras com exceção da amostra NCSG 11 que possui o mesmo tamanho.

Fig. 37 - Potencial Zeta das NCSG produzidas no Planejamento Experimental

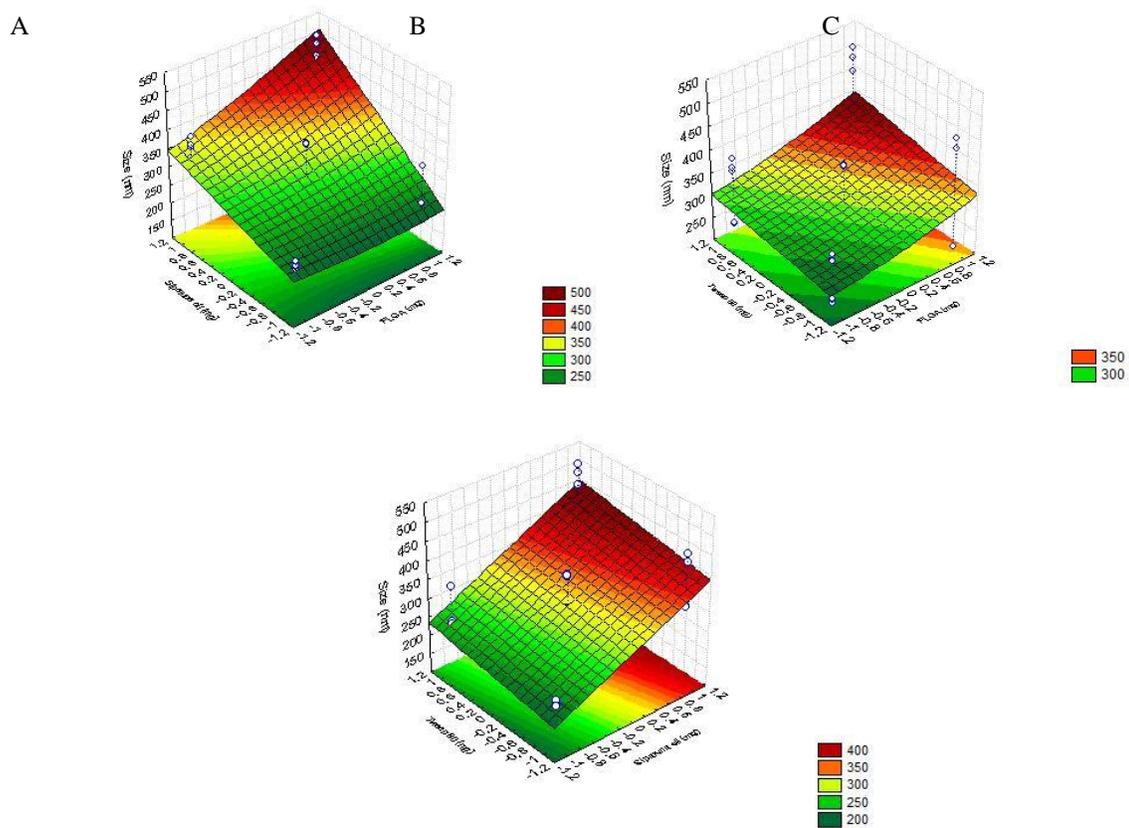


Legenda: Distribuição do tamanho de partículas das NCSG produzidas no planejamento experimental. Os resultados mostram que a NCSG 01 possui diferença significativa em relação as demais formulações  $p < 0.0001$ . O teste ANOVA One-Way foi aplicado.

A formulação NCSG 11 apresentou diferença estatística em relação a todas as outras formulações ( $p < 0.0001$ ) apresentando o resultado com maior potencial Zeta sendo que a formulação NCSG 01 obteve o menor potencial Zeta, indicando instabilidade ao nanossistema (Figura 37).

Por meio dos resultados da caracterização das formulações produzidas segundo o planejamento experimental, foram plotados os gráficos 3D correspondente a superfície de resposta representados na Figura 38.

Figura 38 - Gráficos da superfície de resposta plotados com os resultados da caracterização das NCSG



Legenda: Superfície de resposta 3D para a dependência variável de tamanho de partícula (A) e potencial Zeta (B) com variáveis independentes como quantidade de polímero, OESG e surfactante para produção de nanocápsulas.

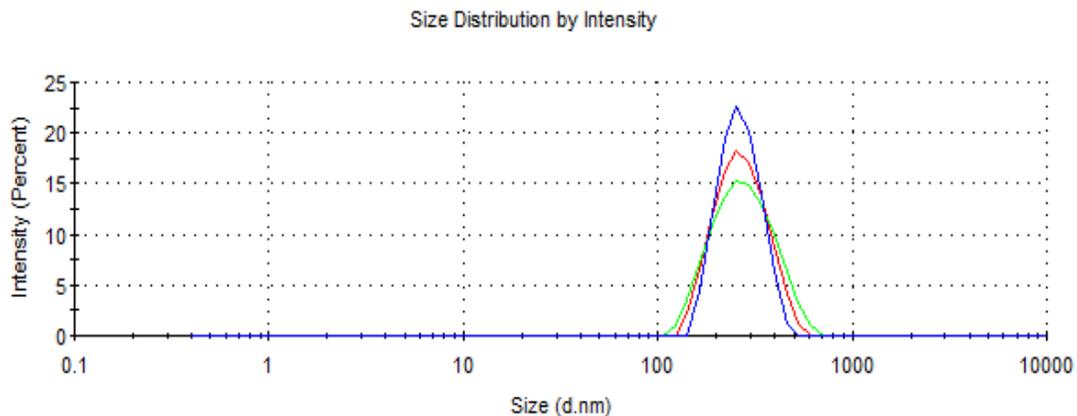
Por meio das análises das variáveis experimentais nas respostas, foram traçadas as superfícies tridimensionais. Os gráficos obtidos mostraram que um diagrama tridimensional do tamanho calculado da superfície de resposta, relacionando a quantidade do OESG e do polímero pré-formado PLGA com o tamanho da nanocápsula contendo OESG. Este diagrama indica que o

tamanho das nanocápsulas pode ser reduzido diminuindo a quantidade de OESG utilizada nas formulações bem como a quantidade de PLGA. A resposta considerando o tamanho das nanocápsulas variou linearmente com cada uma das variáveis, demonstrando que houve interações consideráveis entre cada uma das variáveis independentes e o tamanho das nanocápsulas obtidas nas diferentes condições testadas.

Após a análise dos gráficos correspondentes a superfície de resposta obtidos por meio dos resultados da caracterização das formulações definidas no planejamento experimental, chegou-se a uma formulação final com o seguintes concentrações das variáveis independentes: 70 mg do óleo essencial de *Siparuna guianensis* Aubl., 60 mg do polímero pré-formado de poli (L-ácido láctico-co-ácido glicólico) (PLGA), usados para preparar a fase orgânica juntamente com 25 mg de Epikuron 200 e solubilizados em 6 mL de acetona. Na fase orgânica, obteve-se e 10 mg do polisorbato 80% (surfactante) diluídos em 12 mL de água Miliq vertidos lentamente, gota a gota, na fase orgânica.

As nanocápsulas poliméricas produzidas contendo óleo essencial encapsulado exibiram distribuição unimodal (Figura 39), com índice de polidispersividade igual a  $0,192 \pm 0,35$ , sendo considerado baixo indicando boa homogeneidade entre as partículas da dispersão coloidal.

Figura 39 - Distribuição de diâmetro médio das nanocápsulas de PLGA



Segundo Schaffazick e colaboradores (2003), de forma geral as nanopartículas produzidas de diferentes métodos, apresentam distribuição unimodal e baixo índice de polidispersão. Porém, a composição e a metodologia adotada na produção de nanopartículas poliméricas são fatores que

afetam diretamente em seu diâmetro. As propriedades físico-químicas do óleo essencial como viscosidade, afinidade química (lipofilicidade ou hidrofiliicidade) ou tensão interfacial também pode influenciar no tamanho médio das nanocápsulas.

O potencial Zeta é um parâmetro que indica o potencial de superfície de partículas dispersas, sendo importante para determinar a estabilidade do sistema coloidal, quanto maior o potencial do plano de cisalhamento mais estável é o nanossistema. O potencial Zeta da formulação final produzida foi  $-10,5 \pm 0,44$  mV que, segundo a metodologia, pode indicar boa estabilidade da dispersão produzida.

Nos últimos anos, com o desenvolvimento da nanotecnologia, nanocápsulas poliméricas tem atraído a atenção da comunidade científica devido a sua capacidade de carrear e realizar a liberação controlada de compostos bioativos oriundos de produtos naturais. As nanocápsulas de PLGA são amplamente utilizadas como sistema de liberação de substâncias como curcumina, curcumina, ácido ferúlico, quercitrin, óleos essenciais, extratos vegetais entre outros (Gao et al, 2020). Uma importante propriedade do PLGA, além de sua biocompatibilidade e biodegradabilidade, é a capacidade de transpor a barreira hematoencefálica tornando-se um polímero adequado para transportar substâncias usadas no tratamento de distúrbios neurológicos e psicológicos (MORADI et al, 2020; SAJADIMAJD et al, 2022)

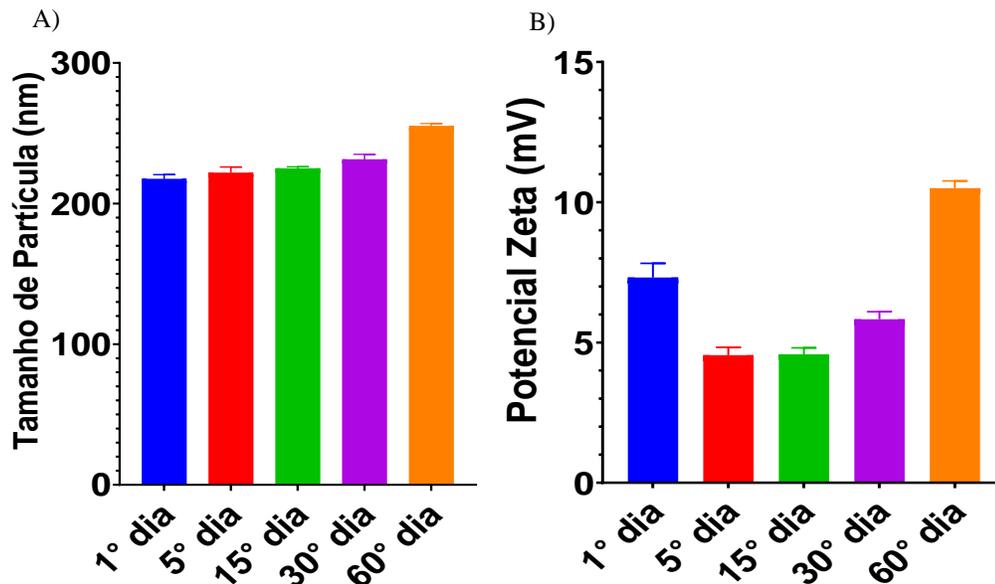
### **8.3 Estabilidade das nanocápsulas**

A estabilidade da nanocápsulas produzidas foi avaliada por um período de 2 meses em termos de tamanho hidrodinâmico, índice de polidispersividade e potencial Zeta, os quais foram mantidos em armazenamento em temperatura de 4 °C. A análise da caracterização físico-química das nanocápsulas poliméricas de PLGA foi realizada logo após a sua produção e as formulações apresentaram aspecto branco leitoso com presença de translucência azulada e ausência de indicadores de instabilidade como cristais, resíduos de óleo essencial, cremagem pelo excesso de polisorbato, sedimentos e aglomerados de polímeros não dispersáveis.

Por meio do planejamento experimental foi possível otimizar a produção das nanocápsulas contendo o OESG cuja formulação final foi monitorada durante o período descrito anteriormente para avaliar sua estabilidade, a qual permaneceu estável durante os 60 dias de análises, apresentando tamanho de partícula de  $255 \pm 1,44$  nm, com índice de polidispersividade de  $0,192 \pm$

0,35 e potencial Zeta  $-10,5 \pm 0,44$  mV. A figura 39 mostra os resultados do monitoramento realizado em sessenta dias em relação aos parâmetros analisados durante o período de armazenamento:

Figura 40 – Monitoramento da estabilidade das NCSG



Legenda: A) monitoramento do tamanho de partícula. B) monitoramento do potencial Zeta.

Os resultados mostraram uma pequena variação em relação ao tamanho das nanocápsulas e em relação ao potencial Zeta, houve um aumento da carga de superfície das partículas indicando boa estabilidade da dispersão coloidal. Quanto ao tamanho de partícula da formulação otimizada não houve diferença estatística em relação as leituras realizadas nos dias 1 e 5 ( $p > 0.05$ ) porém quando comparamos o dia 1 com o dia 15, 30 e 60 há uma diferença significativa ( $p < 0.001$ ). Em relação ao potencial Zeta a leitura realizada no sexagésimo dia apresentou diferença estatística em relação ao primeiro dia ( $p < 0.0001$ ) (Figura 40).

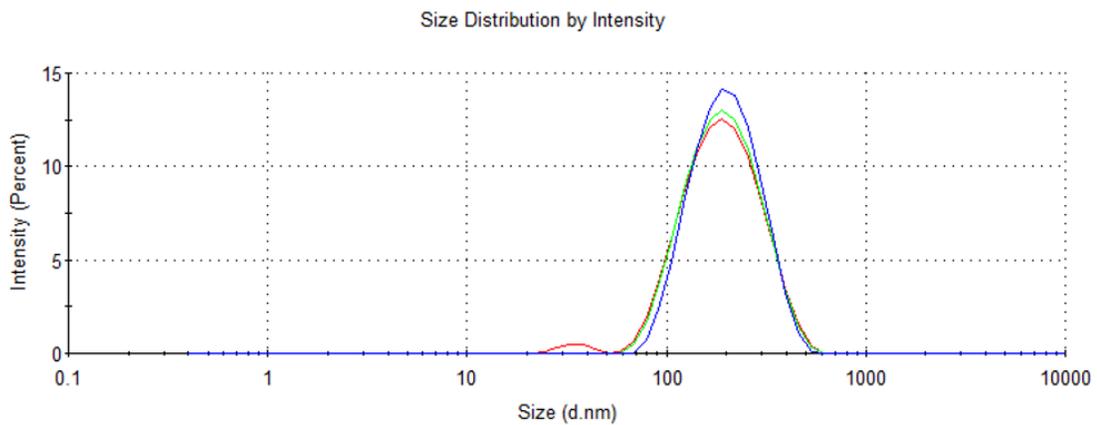
#### 8.4 Produção e otimização da produção de nanocápsulas contendo o OESG revestidas com quitosana.

O encapsulamento OESG em nanocápsulas pelo método de polimerização interfacial de utilizando o polímero pré-formado poli (L-ácido láctico-co-ácido glicólico) (PLGA) foi realizado, porém os resultados da caracterização mostraram que os valores do potencial Zeta das formulações

produzidas foram todos baixos e negativos, o que indica instabilidade ao sistema. Desta forma, foi empregado o uso de quitosana solúvel em água para revestir a superfície das nanocápsulas tornando-as positivas, além disso, a quitosana também possui a característica de aumentar o potencial Zeta tornando a suspensão coloidal ainda mais estável (XAVIER-JUNIOR et al, 2018).

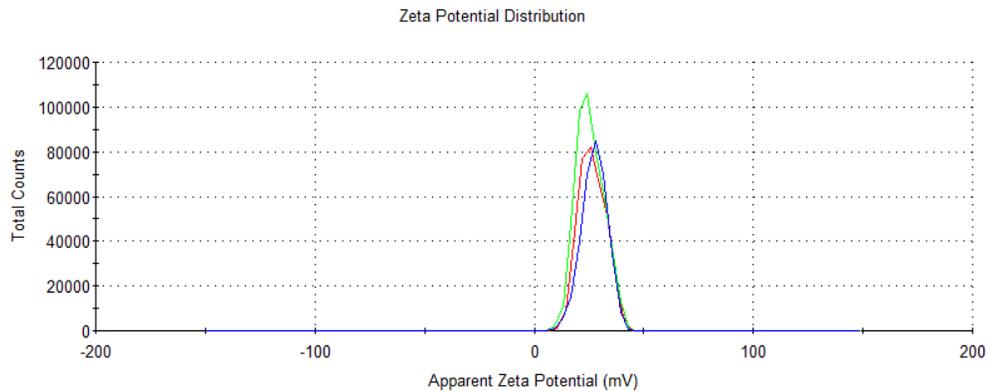
As nanocápsulas foram projetadas por meio de polimerização interfacial do copolímero poli (ácido lático-co-ácido glicólico) (PLGA) e produzidas com o óleo natural bioativo e quitosana solúvel em água. Por meio do planejamento experimental, foi possível obter uma formulação ideal, purificada e estável a qual foi revestida com quitosana apresentando diâmetro  $112.8 \pm 0.51$  nm de diâmetro, com índice de polidispersividade de  $0,342 \pm 0,036$  e potencial Zeta  $26,5 \pm 0.95$  mV (Figura 39/40). O valor positivo do potencial Zeta indica que a adsorção da quitosana na superfície das nanocápsulas.

Figura 39 - Distribuição de diâmetro médio das nanocápsulas de PLGA revestidas com quitosana



Segundo Dimer et al (2020) a carga superficial das nanocápsulas são um ponto chave para a entrega de substâncias intracelular e transposição da barreira hematoencefálica. Devido a carga negativa e hidrofiliçidade das nanocápsulas de PLGA, a passagem pela barreira se torna ainda mais difícil e por isso o revestimento com quitosana torna possível essa passagem pois sua mucoadesividade mediada pelas interações eletrostáticas positivas com a mucina presente na mucosa dos epitélios que possui carga negativa. Essa interação promove a passagem de macromoléculas pelos epitélios organizados, apresentando baixa toxicidade e biodisponibilidade.

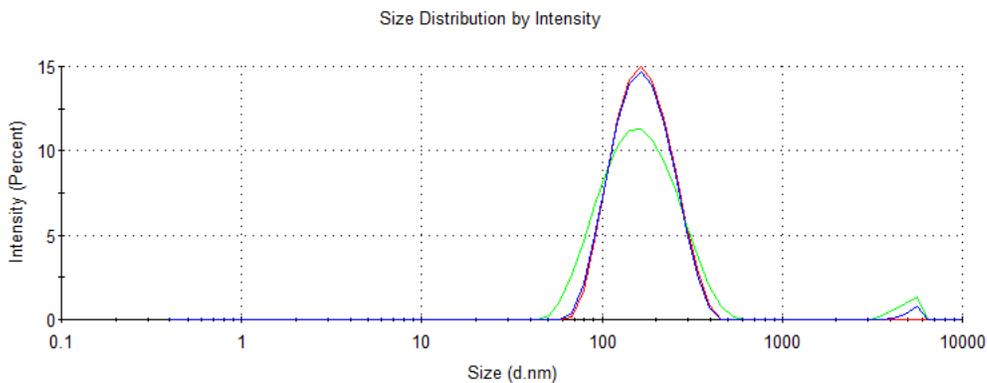
Figura 40 - Distribuição de Potencial Zeta das nanocápsulas de PLGA revestidas com quitosana



### 8.5 Produção e otimização das nanocápsulas contendo o OESG marcadas com Nile red

As nanocápsulas de PLGA revestidas com quitosana foram marcadas com Nile red utilizando o mesmo processo citado no item 5.4. As nanocápsulas foram projetadas por meio de polimerização interfacial utilizando poli (ácido lático-co-ácido glicólico) (PLGA) com a adição de 0.25 mg/mL na fase orgânica. Por meio do planejamento experimental, foi possível obter uma formulação ideal, purificada e revestida com quitosana apresentando diâmetro de  $153.4 \pm 0.16$  nm, com índice de polidispersividade de  $0,227 \pm 0,032$  e potencial Zeta  $32.4 \pm 1.65$  mV (Figura 41).

Figura 41 - Distribuição de diâmetro médio das nanocápsulas de PLGA revestidas com quitosana e marcadas com Nile red.

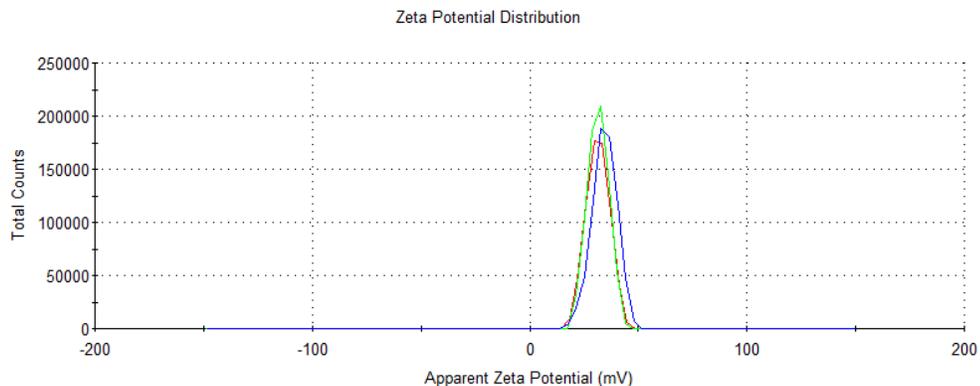


O tamanho das nanocápsulas revestidas com quitosana foi inferior as nanocápsulas preparadas apenas com PLGA enquanto o potencial Zeta apresentou uma mudança de carga e

aumento para  $26,5 \pm 0.95$  mV enquanto as nanocápsulas marcadas com Nile red obtiveram tamanho maior, porém potencial Zeta mais alto  $32.4 \pm 1.65$  mV (Figura 40).

Ferreira et al (2019) produziram nanopartículas de quitosana na encapsulação do óleo essencial de *Siparuna guianensis* avaliaram sua eficiência no controle de larvas de *Aedes aegypti*. Com 88% de eficiência de encapsulamento e diâmetro médio de  $84 \pm 15$  nm as nanopartículas de quitosana mostraram-se eficientes e prolongaram sua atividade no controle de larvas de *Aedes aegypti*. Além disso, a nanoencapsulação polimérica de óleos essenciais tornou-se uma técnica promissora para superar as limitações desses produtos naturais de origem vegetal como alta volatilidade, rápida oxidação e degradação em contato com o ar, além de sua baixa solubilidade em água. Em outro trabalho realizado por Ferreira e colaboradores (2019) foram produzidas nanoemulsões com o óleo essencial de *Siparuna guianensis* Aubl. com o objetivo de avaliar sua eficácia em potencializar a atividade larvicida contra o mosquito *Aedes aegypti*. O tamanho médio das gotículas formadas ficou em torno de 180 nm e se mantiveram estáveis por aproximadamente 30, sendo que tanto o óleo essencial quanto a nanoemulsão apresentaram atividade larvicida promissora, porém a nanoemulsão apresentou atividade superior quando comparada ao óleo essencial. Portanto, diferentes tipos de nanocarreadores podem ser utilizados para carrear o óleo essencial de *Siparuna guianensis* Aubl. de forma eficiente, melhorando sua eficácia, driblando as propriedades físicas e químicas apresentadas por óleos essenciais e potencializando sua atividade biológica.

Figura 42 - Distribuição de Potencial Zeta das nanocápsulas de PLGA revestidas com quitosana e marcadas com Nile red.



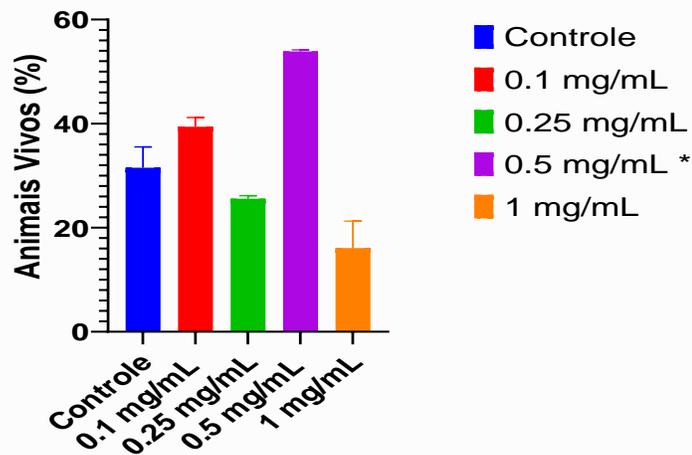
## 8.6 Toxicidade das NCSG em *C. elegans*

Produtos naturais de origem vegetal como óleos essenciais extraídos de determinadas espécies podem apresentar toxicidade a organismos vivos como o *C. elegans* e esta desvantagem pode ser contornada com o emprego de técnicas nanotecnológicas (KUMARI; LUQMAN; MEENA, 2019). Uma dessas técnicas é uso de nanopartículas poliméricas que podem carrear óleos essenciais em seu núcleo como as nanocápsulas e contornar as limitações apresentadas pelos óleos essenciais como baixa absorção, alta toxicidade, biodisponibilidade, eficácia e outros efeitos colaterais (WORRAL et al, 2018). Sathya et al (2020) produziu em seu trabalho nanopartículas de PLGA contendo fitol (terpeno constituinte da clorofila) e em seu trabalho foi observado que as nanocápsulas de PLGA contendo fitol não foram tóxicas ao verme, aumentando sua longevidade bem como conseguiu diminuir o estresse proteotóxico causado pelo acúmulo da A $\beta$  nas cepas CI2006 e CI4176. Neste trabalho, o OESG não diminuiu a taxa de sobrevivência dos animais testados assim como as nanocápsulas poliméricas biodegradáveis contendo o óleo essencial de *Siparuna guianensis* Aubl. utilizando o polímero PLGA (NCSG) não apresentaram toxicidade, sendo possível dar continuidade aos ensaios posteriores.

## 8.7 Ensaio de resistência ao estresse oxidativo

Além dos ensaios de resistência ao estresse oxidativo realizados em condições normais com o OESG, também foi avaliado a capacidade das NCSG aumentarem a atividade antioxidante do óleo *in natura*. Analisando a figura 43 foi possível observar que os animais tratados com as NCSG na concentração de 0.5 mg/mL obtiveram um aumento em relação ao estresse oxidativo causado pelo agente estressor T-BOOH quando comparado aos grupos controle e DMSO 0.5%. O grupo tratado com a mesma concentração do óleo essencial não nanoencapsulado não obteve o mesmo resultado, ou seja, não aumentou a resistência ao estresse oxidativo dos vermes. As demais concentrações não apresentaram diferença estatística, não interferindo de forma positiva na resistência ao estresse oxidativo dos animais. Os resultados indicam, portanto, que o tratamento com as NCSG nas concentrações de 0.1, 0.25 e 1 mg/mL não é capaz de aumentar a resistência dos animais *C. elegans* tipo selvagem quando submetidos ao estresse oxidativo, enquanto a concentração de 0.5 mg/mL foi capaz de aumentar essa resistência.

Figura 43 – Efeito do NCSG sobre a resistência ao estresse oxidativo em *C. elegans*.



Legenda - Efeito do tratamento com NCSG nas concentrações de 0,1, 0,25, 0,5 e 1,0 mg/mL, controle com OP50, sobre a sobrevivência dos animais tipo selvagem submetidos às condições normais e de estresse oxidativo induzido por hidroperóxido de terc-butílo (t-BOOH) 10 mM por 24 horas. A barra de erros representa os valores  $\pm$  SEM. O símbolo \* representa o resultado significativo em comparação com o DMSO (0.5%) determinados pelo Ordinary one-way ANOVA ( $p < 0,05$ ).

Dados científicos mostram que animais da espécie *C. elegans* quando tratados com nanocápsulas de polímeros como PCL ou PLGA, por exemplo, não apresentam diminuição em sua taxa de sobrevivência, ou seja, não são tóxicas aos vermes. Sathya et al (2020) avaliou a atividade biológica das nanocápsulas de PLGA carregadas com fitol e não houve indício de toxicidade nos ensaios realizados. Além disso, as nanocápsulas de fitol foram capazes de reduzir a deposição de  $\beta$ -amilóide nos vermes bem como a produção de espécies reativas de oxigênio, evitando danos causados pelo estresse oxidativo.

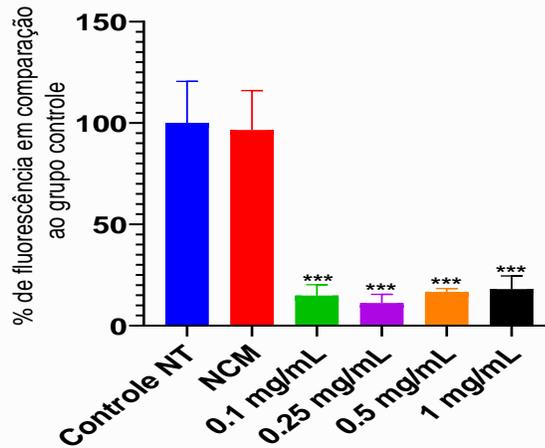
### 8.8 Efeito do tratamento das NCSG no acúmulo de ERO intracelular no modelo *C. elegans*

O presente estudo teve como objetivo investigar a atividade antioxidante das NCSG por meio da redução de espécies reativas de oxigênio em *C. elegans* e conseqüentemente o efeito sobre a sobrevivência dos animais em condições normais. A figura 44 mostra os resultados obtidos por meio do tratamento com diferentes concentrações do NCSG (0,1, 0,25, 0,5 e 1 mg/mL) foram capazes de reduzir significativamente os níveis de espécies reativas de oxigênio quando comparadas ao grupo controle.

Os resultados sugerem que o homogenato de *C. elegans* tratado previamente com o NCSG diminuiu a produção de espécies reativas de oxigênio como mostra a baixa emissão de

fluorescência em todas as concentrações quando comparados aos grupos controle (sem tratamento) e o grupo NCM (nanocápsula sem o OESG).

Figura 44 - Quantificação de espécies reativas de oxigênio intracelular (ERO's), no modelo *C. elegans*.



Legenda: Efeito das NCSG sobre a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO's) intracelular no modelo *C. elegans*. Cada grupo foi tratado nas concentrações de 0.1, 0.25, 0.5 e 1 mg/mL além dos grupos controle com OP50 e NCM. A quantificação de fluorescência emitida pela sonda H<sub>2</sub>DCFDA foi medida utilizando o sistema de detecção GloboMax®-mult (Promega, Madison, WI, EUA), com excitação em 485 nm e emissão em 510-570 nm. Os resultados foram significativos quando comparados ao grupo NCM representados pela média ± SEM com valores de \*\*\*p=0,0003, \*\*\*p=0,0003, \*\*\*p<0,0003, \*\*\*p<0,0003. Os ensaios foram realizados em triplicata biológica e a análise estatística foi determinada pelo modelo Ordinary one-way ANOVA.

A figura 425 mostra os resultados do homogenato de *C. elegans* tratado previamente com as diferentes concentrações das NCSG. Foi possível observar que as NCSG diminuíram a produção de espécies reativas de oxigênio como sugere a baixa emissão de fluorescência da sonda em todas as concentrações quando comparados com o grupo controle. Além disso, as NCSG demonstraram um melhor efeito antioxidante quando comparados aos tratamentos realizados com o OESG, este fato pode estar relacionado as inúmeras vantagens relacionadas as nanocápsulas como o transporte direcionado as células alvo bem como a biocompatibilidade e biodisponibilidade e aprimoramento da capacidade terapêutica (MAHADI et al, 2021; NAZ; SIDDIQUE, 2021).

O efeito antioxidante dos óleos essenciais é extremamente importante para a manutenção de organismos vivos devido a sua composição química. Muitos compostos presentes nos óleos essenciais podem agir de forma benéfica combatendo processos nocivos causados pelo estresse oxidativo de radicais livres e espécies reativas de oxigênio cujo acúmulo acarreta processos neurodegenerativos e envelhecimento (Singh et al, 2019). Além disso, a nanotecnologia oferece inúmeras vantagens para potencializar a eficácia das propriedades terapêuticas dos óleos essenciais,

como por exemplo, aprimorar a solubilidade desses óleos em meio aquoso bem como melhorar a estabilidade de ativos sensíveis que podem estar presentes em sua composição química.

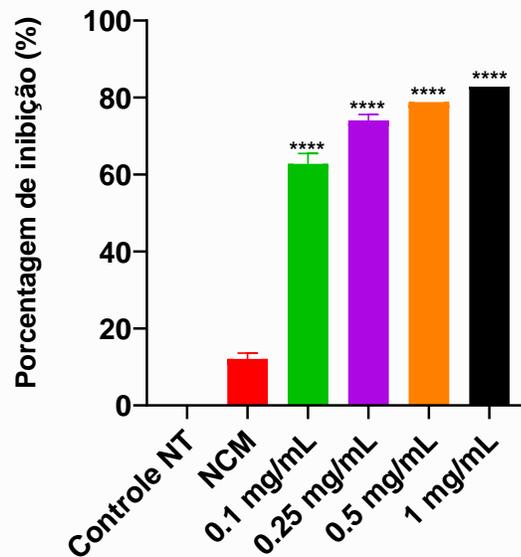
A composição química do OESG possui terpenóides e fenilpropanóides como componentes majoritários (iso-shyobunona, epi-shyobunona, t-muurolol e a-muuroleno) que podem estar relacionados com a propriedade antioxidante como mostra alguns trabalhos encontrados na literatura. Ivanović e colaboradores (2021) analisaram a atividade antioxidante dos óleos essenciais de algumas espécies da família do gengibre (Zingiberaceae) *Elettaria cardamomum* L. Maton (cardamomo), *Curcuma Longa* L. (cúrcuma), *Zingiber Officinale* Roscoe (gengibre) e *Alpinia Officinarum*Hance (galanga) e comprovaram suas propriedades antioxidantes devido aos terpenóides presentes em sua composição química.

### **8.9 Ensaio de inibição da AChE em *C. elegans***

Neste trabalho foi demonstrado a capacidade do OESG inibir a enzima AChE por meio de ensaios *in vitro* e *in silico*, além de elucidar os mecanismos de interação das substâncias presentes no óleo essencial e a enzima AChE (MARTINS et al, 2021). Desta forma, foi utilizado o ensaio *in vivo* utilizando o homogenato de *C. elegans* tratado com o OESG e das NCSG para avaliar sua atividade anticolinesterásica. Os animais foram tratados com diferentes concentrações das NCSG e após a preparação do homogenato e realização dos ensaios, os resultados apresentaram inibição significativa quando comparadas ao grupo sem tratamento e ao grupo tratado com NCM (nanocápsulas com migliol) ( $p < 0.05$ ).

Os resultados do tratamento dos animais com as NCSG foram ligeiramente mais eficazes quando comparados aos ensaios utilizando apenas o óleo *in natura* como mostra a figura 45. Os testes foram realizados utilizando os mesmos critérios metodológicos sendo possível observar que as NCSG foram capazes de aumentar a inibição da AChE em até 82,8%, sendo considerado potencialmente inibitória.

Figura 45 – Efeito do NCSG sobre a AChE do homogenato do *C. elegans* em porcentagem



Legenda – Resultados de ensaio de inibição da AChE em animais do tipo selvagem (WT). O homogenato dos animais tratados ou não com diferentes concentrações das NCSG, os quais foram quantificados, transferidos para placas de 96 poços e mensurados em leitor de microplacas a 405nm após um período de incubação de 1 hora. NCM: nanocápsulas sem OESG. Dados estatísticos sugerem que os resultados foram significativos quando comparados ao grupo controle, representados pela média  $\pm$  SEM e valor de \*\*\*\* $p < 0,0001$  determinados pelo teste Ordinary one-way ANOVA.

Li et al (2020) focou seu trabalho na atividade inibitória de flavonóides oriundos da planta *Eupatorium adenophorum* frente a AChE utilizando o homogenato de *C. elegans*. De acordo com os resultados, os compostos químicos presentes no óleo essencial da espécie interagiram significativamente com a enzima e a hidroxilação potencializou a interação. Portanto o estudo em questão tentou validar a *E. adenophorum* como fonte de inibidores da AChE sugerindo que estes compostos podem ser úteis para a descoberta de novos inibidores da AChE.

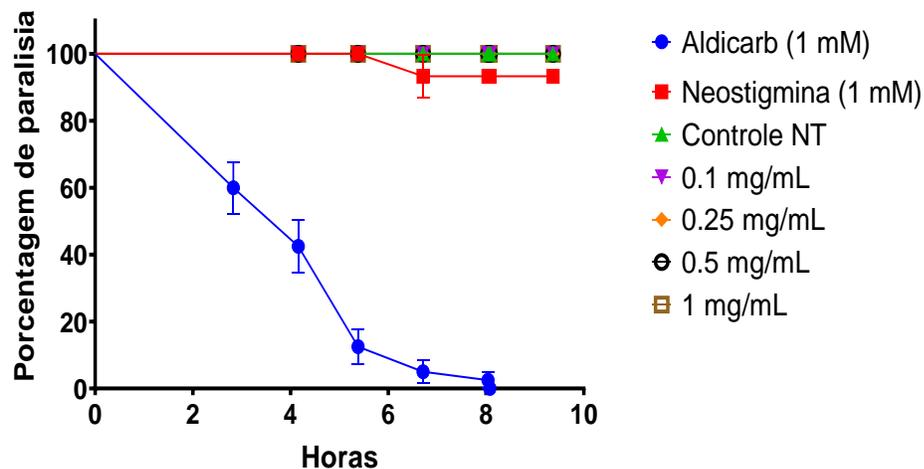
### 8.10 Ensaio de paralisia induzida por Aldicarb para determinar defeitos na transmissão sináptica em *Caenorhabditis elegans*

O Aldicarb é uma substância bastante utilizada como pesticida e nematicida, agindo como um inibidor da AChE e preventor da hidrólise do neurotransmissor acetilcolina nas fendas sinápticas (IZQUIERDO et al, 2021). Esta reação de interação causa o acúmulo de ACh nas fendas sinápticas causando uma superativação dos receptores musculares de ACh o que por sua vez leva a contração dos músculos e, conseqüentemente, os vermes ficam paralisados ao longo do tempo.

O tempo necessário para que os animais fiquem paralisados por Aldicarb depende da capacidade de transmissão dos neurônios e a ACh, ou seja, ocorre de acordo com a secreção de ACh na fenda sináptica (OH; KIM, 2017; REFAI; BLAKELY, 2017).

Após o período de 1 hora os vermes tratados com Aldicarb começaram a paralisar, porém os vermes tratados com Neostigmina e as diferentes concentrações NCSG não paralisaram (Figura 46). A Neostigmina é um medicamento padrão utilizado no tratamento do Alzheimer devido a suas propriedades terapêuticas ligadas aos déficits de produção de ACh em mamíferos e seu mecanismo de interação com a AChE também é reversível (ELDUFANI; BLAISE, 2019; PULLAGURI; KAGOO; BHARGAVA, 2022). Porém, em um trabalho realizado por Kalinnikova et al (2013), após a investigação sobre a baixa concentração de ACh em *C. elegans* devido ao estresse térmico, foi relatado que para a Neostigmina obtivesse um efeito tóxico (paralisante) semelhante ao Aldicarb seria necessário realizar o experimento utilizando uma concentração mais elevada (igual ou maior que 6 mM) a uma temperatura de 22°. Entretanto, em concentrações mais baixas (0,1-0,7 mM) a Neostigmina causou aumento no comportamento de termotolerância revelando um aumento do tempo médio da capacidade dos vermes de manter um comportamento coordenado (natação, induzida por estímulo mecânico) a uma temperatura constante de 36 °C.

Figura 46 - Efeito do tratamento com NCSG sobre o fenótipo de paralisia induzida por Aldicarb



Legenda – Resultados de ensaio de Aldicarb em animais do tipo selvagem (WT). Os animais foram incubados em placas com Aldicarb 1 mM. Os animais foram incubados em placas com Aldicarb, Neostigmina (1mM) e diferentes concentrações do NCSG (0.1, 0.25, 0.5 e 1 mg/mL). Os animais ficaram paralisados pelo Aldicarb em menos tempo do que os animais dos outros grupos. Os dados estatísticos sugerem que os resultados foram significativos, representados pela média  $\pm$  SEM e valor de \*\*\*\*p < 0,0001 determinados pelo teste Log Rank (Mantel-Cox).

A Neostigmina é comumente usada na medicina para tratar distúrbios relacionados a baixa produção de ACh e estudos neurofisiológicos em mamíferos (LUO et al, 2018). Segundo Egorova et al (2021) o efeito tóxico do Aldicarb no *C. elegans* é aumentado pela ação dos neurotransmissores octopamina e dopamina na locomoção dos nematóides e que para a Neostigmina exibir efeito tóxico semelhante ao Aldicarb seria necessário utilizar uma concentração 60 vezes, pois os efeitos terapêuticos dos inibidores da AChE são mostrados apenas nos estados de deficiência de ACh do sistema colinérgico.

Sugere-se que as NCSG devem ser utilizadas em concentrações mais altas para exibirem toxicidade e conseqüentemente paralisia semelhante ao Aldicarb, uma vez que as concentrações utilizadas obtiveram efeito semelhante a Neostigmina, ou seja, não paralisaram os animais e não apresentaram sinais de baixas nas taxas de sobrevivência dos vermes exibindo um possível efeito terapêutico.

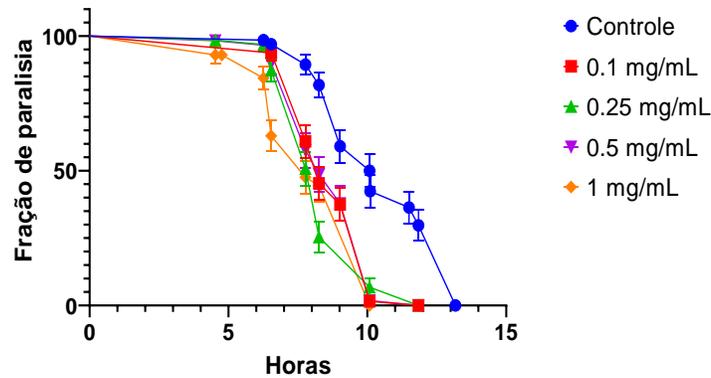
### **8.11 Ensaio de paralisia induzida por acúmulo da $\beta$ -amilóide em *Caenorhabditis elegans***

A deposição extracelular do fragmento de proteína  $\beta$ -amilóide acarreta a formação de placas senis, disfunção sináptica e neurodegeneração dos neurônios, sendo uma das principais hipóteses sobre o surgimento do Alzheimer em pessoas idosas (LONG; HOLTZMAN, 2019). O nematódeo *C. elegans* é um ótimo modelo *in vivo* para avaliar e realizar a triagem de substâncias ativas oriundas de produtos naturais capazes de impedir, proteger ou diminuir a produção e acúmulo de proteínas humanas que tendem a se agregar ( $\beta$ -amilóide) de forma constitutiva nos músculos ou neurônios do verme. Para determinar se as NCSG de proteger o *C. elegans* contra a toxicidade induzida por  $A\beta$  *in vivo*, foi avaliada a eficácia das NCSG em retardar a paralisia induzida por  $A\beta$  em vermes transgênicos CL2006 que expressam a proteína  $A\beta$  humana da forma constitutiva a qual é direcionada para as células musculares levando o verme ao fenótipo de paralisia que é acelerada pelo aumento da temperatura (35° C). Os vermes foram tratados com diferentes concentrações das NCSG (0.1, 0.25, 0.5 e 1 mg/mL) em placas de petri de 60 mm 20°C por 2 dias.

As NCSG testadas nas mesmas concentrações que o OESG (0.1, 0.25, 0.5 e 1 mg/mL) não puderam evitar ou diminuir o estresse proteotóxico causado pela da formação da  $\beta$ -amilóide nos músculos dos vermes. De acordo com a figura 47, as NCSG levaram os vermes a paralisar antes do

grupo sem tratamento de forma significativa, sugerindo que a paralisia ocorreu devido a inibição da AChE a qual aumentou os níveis de ACh juntamente com o acúmulo do fragmento de proteína  $\beta$ -amilóide.

Figura 47 - Efeito do tratamento com NCSG sobre o fenótipo de paralisia.



Legenda - Curvas de paralisia para cepas de *C. elegans* expressando  $\beta$ -amilóide muscular de forma constitutiva (CL2006) tratadas com (0.1, 0.25, 0.5 e 1 mg/mL) de NCSG de L1 até L4. Para acelerar a paralisia, os vermes CL2006 foram transferidos para 35°C. A paralisia foi verificada em intervalos de 1 h a 35°C. As cepas tratadas mostraram progressão acelerada da paralisia corporal em comparação com vermes do grupo controle. Resultados significativos para todos os grupos tratados em comparação ao controle ( $p < 0.0001$ ), de acordo com o teste log-rank (Mantel-Cox).

Os vermes tratados com as diferentes concentrações do NCSG paralisaram antes do grupo controle. Este fato pode ser em decorrência do acúmulo da  $\beta$ -amilóide no músculo dos vermes bem como o aumento de concentração da ACh nos vermes devido a inibição da AChE. Estes dois fatores podem contribuir para a paralisia do verme, diferente do que ocorre no experimento de paralisia induzida por Aldicarb (item 8.11), onde só existe um fator e as concentrações de ACh no verme não são suficientes para fazer o verme paralisar, pois a Neostigmina somente possui efeito tóxico ao verme semelhante ao Aldicarb em doses altas, efeito que provavelmente ocorre com as NCSG.

No trabalho realizado por Sathya e colaboradores (2020), nanocápsulas poliméricas de PLGA contendo fitol foram capazes de não só aumentar a taxa de sobrevivência das cepas CL 2006 e CL 4176 como diminuíram a formação da  $\beta$ -amilóide nos músculos dos vermes. Além disso, essas cepas transgênicas se movimentam de forma rolante e à medida que o verme envelhece e há o acúmulo da  $\beta$ -amilóide nos músculos o verme paralisa e deixa de rolar e foi ilustrado que o tratamento com fitol e nanocápsulas de fitol foi capaz de aliviar a patogênese da DA nos vermes transgênicos que expressam a  $A\beta$  obtendo paralisia retardada e movimento melhorado.

## 9 CONCLUSÃO

A extração do óleo essencial da espécie *Siparuna guianensis* Aubl. ocorreu durante a estação chuvosa e a caracterização da composição química mostrou que havia predominância do composto shyobunona e derivados (iso-shyobunona, epi-shyobunona e epi-shyobunol) em sua composição. Espectrofotometria de fluorescência, Titulação em RMN  $^1\text{H}$  e acoplamento molecular foram empregadas para avaliar vários aspectos da interação entre o inibidor (óleo essencial) e a enzima acetilcolinesterase (AChE). Nos ensaios de inibição espectrofotométrica com AChE de ostra, camarão (extratos) e de enguia elétrica (enzima comercial), o óleo essencial mostrou um alto efeito inibidor denotado pelos baixos valores de  $\text{IC}_{20}$  e  $\text{IC}_{50}$ . Os estudos de supressão de fluorescência mostraram que os compostos presentes no óleo essencial interagem com o sítio ativo do AChE de forma estática devido à diminuição da constante Stern-Volmer ( $K_{sv}$ ) com temperatura crescente. Além disso, os resultados da titulação de RMN  $^1\text{H}$  sugerem que os picos correspondentes aos compostos de shyobunona e iso-shyobunona presentes no óleo essencial diminuem à medida que a enzima foi titulada, indicando a ocorrência da interação entre enzima e óleo, o que também foi verificado por acoplamento molecular que previa que o resíduo de triptofano 146 é capaz de atuar como um doador de ligação de H para as moléculas de ambos os lados, com a iso-shyobunona sendo o ligante mais forte, mas apenas por uma pequena diferença. Até o presente momento, o óleo essencial da planta neogramina (*Siparuna guianensis* Aubl.) do norte da Amazônia pode ser uma nova fonte de shyobunona e seus derivados que são capazes de inibir reversivelmente a AChE, com potenciais propriedades neuroprotetoras a serem aplicadas no tratamento de doenças neurodegenerativas como o mal de Alzheimer.

A nanoencapsulação do óleo essencial da planta *Siparuna guianensis* Aubl. foi realizado com sucesso por meio do método de polimerização interfacial (nanoprecipitação). Além disso, o planejamento experimental do tipo Box Benkem apresentou-se como uma ótima ferramenta na otimização das nanocápsulas poliméricas biodegradáveis de poli (L-ácido láctico-co-ácido glicólico) (PLGA) contendo o óleo essencial de *Siparuna guianensis*. Por meio das análises dos gráficos da superfície de resposta uma dispersão coloidal ideal e estável foi obtida, exibindo diâmetro de partícula de  $255 \pm 1,44$  nm, com índice de polidispersividade de  $0,192 \pm 0,35$  e potencial Zeta  $-10,5 \pm 0,44$  mV, não apresentando sinais de instabilidade durante 60 dias. Além disso, foi possível obter uma formulação ideal, purificada e estável a qual foi revestida com

quitosana apresentando diâmetro  $112.8 \pm 0.51$  nm de diâmetro, com índice de polidispersividade de  $0,342 \pm 0,036$  e potencial Zeta  $26,5 \pm 0.95$  mV.

A atividade biológica do óleo essencial de *Siparuna guianensis* Aubl. (OESG) *in natura* e nanoencapsulado usando o modelo de *Caenorhabditis elegans* revelou que não houve diminuição na taxa de sobrevivência dos animais tratados. O OESG é composto quimicamente de terpenos e fenilpropanóides sendo que estas substâncias possuem atividade biológica amplamente exploradas em diversos trabalhos encontrados na literatura principalmente como inibidores da enzima acetilcolinesterase (AChE). Alguns óleos essenciais de plantas aromáticas como a cidra (*Citrus medica* cv. *sarcodactylis*) possuem efeito nematocida representando um problema em estudos com *C. elegans*, porém o ensaio de sobrevivência realizada neste estudo revelou que o OESG e as NCSG não são tóxicos aos vermes.

Os ensaios para verificar a atividade antioxidante *in vitro* revelaram que 100 µg do OESG apresentou atividade com aproximadamente 379,16 mg de ácido ascórbico equivalente. A capacidade antioxidante total do OESG sugere que os compostos presentes em sua composição química são capazes de doar elétrons em meio ácido e por meio do ensaio de poder redutor verificou-se que o OESG (concentrações de 0.05 a 1 mg/mL) apresentou um poder redutor de quase 50% na concentração de 0,1 mg/mL e maior que 100% na concentração de 1 mg/mL. Porém, no ensaio para avaliar a capacidade dos compostos presentes no OESG de sequestrar o radical este radical livre, verificou-se que o OESG (concentrações de 0,25 a 5 mg/mL) apresentou capacidade de sequestro de apenas 20% na concentração de 0,5 mg/mL.

No ensaio de resistência ao estresse oxidativo utilizando o agente estressor t-BOOH, foi observado que após 24 horas do início do estresse, a fração sobrevivente de animais tratados com 0.1 e 0.25 mg/mL de OESG promoveu um aumento significativo em comparação com animais tratados com DMSO 0.5% ( $p \leq 0,05$ ). Em relação ao ensaio para verificar a capacidade do OESG e das NCSG em reduzir as espécies reativas de oxigênio intracelular no *C. elegans* em condições normais, os resultados mostraram que o tratamento com diferentes concentrações do OESG (0.1, 0.25, 0.5 e 1 mg/mL) foram capazes de reduzir significativamente os níveis de EROs quando comparadas ao grupo DMSO 0.5% ( $p < 0.05$ ). Do mesmo modo, as NCSG diminuíram a produção de espécies reativas de oxigênio como sugere a baixa emissão de fluorescência, demonstrando um melhor efeito antioxidante quando comparados aos tratamentos realizados com o OESG.

Neste trabalho foi demonstrado a capacidade do OESG inibir a enzima AChE por meio de ensaios *in vitro* e *in silico*, além de elucidar os mecanismos de interação das substâncias presentes no óleo essencial e a enzima AChE. Após o tratamento dos animais com o OESG foi observado que todas as concentrações (0.1, 0.25, 0.5 e 1 mg/mL) apresentaram inibição significativas, com percentual de até 72.3% de inibição. Os resultados do tratamento dos animais com as NCSG foram ligeiramente mais eficazes quando comparados aos ensaios utilizando apenas o óleo *in natura*, sendo capaz de aumentar a inibição da AChE em 82,8%, considerado potencialmente inibitório.

No ensaio de paralisia por Aldicarb, foi observado que a Neostigmina, o OESG e as NCSG não foram capazes de paralisar o verme por meio do aumento de ACh nos músculos. Neste trabalho por meios dos ensaios *in vitro* e *in vivo*, foi relatado que o mecanismo de interação entre o OESG e a enzima AChE é reversível igualmente ao Aldicarb. Além disso, para que o OESG e as NCSG obtivessem o mesmo efeito tóxico que o Aldicarb seria necessário utilizar concentrações mais altas, uma vez que as concentrações utilizadas obtiveram efeito semelhante a Neostigmina, ou seja, não paralisaram os animais e não apresentaram sinais de baixas nas taxas de sobrevivência dos vermes exibindo um possível efeito terapêutico.

Os resultados do ensaio de paralisia induzida por  $\beta$ -amilóide em vermes transgênicos (CL 2006) mostraram que o OESG não teve efeito na vida útil dos nematoides, sendo sugerido que as concentrações utilizadas não eram tóxicas para os vermes. Além disso, Foi observado que os vermes tratados com o OESG paralisaram antes que os grupos sem tratamento e DMSO 0,5%, obtendo resultados não significativos. Este fato pode ser em decorrência do acúmulo da  $\beta$ -amilóide no músculo dos vermes bem como o aumento de concentração da ACh nos vermes devido a inibição da AChE, por isso, sugere-se que estes dois fatores podem contribuir para a paralisia mais acelerada do verme. Do mesmo modo, as NCSG testadas nas mesmas concentrações (0.1, 0.25, 0.5 e 1 mg/mL) não puderam evitar ou diminuir o estresse proteotóxico causado pela da formação da  $\beta$ -amilóide nos músculos do verme, causando paralisia antes do grupo sem tratamento de forma significativa.

Em resumo, os resultados desta pesquisa sugerem que OESG apresentou atividade antioxidante e anticolinesterásico *in vitro* e *in vivo*, sendo que as NCSG foram mais eficazes devido as vantagens apresentadas por técnicas nanotecnológicas. Porém, em relação a proteção contra proteínas anormais em vermes com a  $\beta$ -amilóide, não foi observado nenhum efeito contra o estresse proteotóxico. Decerto, os resultados eficazes do nanoencapsulamento do OESG sugerem que

produtos naturais como óleos essenciais podem ter seu efeito terapêutico potencializado, fornecendo novos insights para desenvolver estratégias de tratamento para doença de Alzheimer utilizando o OESG *in natura* e nanoencapsulado.

## 10 REFERÊNCIAS

ABU-DAHAB, R.; ODEH, F.; ISMAIL, S. I.; AZZAM, H.; AL BAWAB, A. Preparation, characterization and antiproliferative activity of thymoquinone-beta-cyclodextrin self-assembling nanoparticles. *Pharmazie*, v. 68, n. 12, p. 939-44, 2013.

AGARWAL, N.; SHUSTA, E. V. Multiplex expression cloning of blood-brain barrier membrane proteins. *Proteomics*, v. 9, n. 4, p. 1099-108, 2009.

AGUIAR, R.W.S.; DOS SANTOS, S.F.; DA SILVA, M. F.; ASCENCIO S.D.; DE MENDONÇA, L. M.; VIANA, K.F. Insecticidal and Repellent Activity of *Siparuna guianensis* Aubl. (Negramina) against *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus*. *PLoS ONE* 10(2): e0116765, 2015.

AHMAD, N.; AHMAD, R.; ALAM, M. A.; SAMIM, M.; IQBAL, Z.; AHMAD, F. J. Quantification and evaluation of thymoquinone loaded mucoadhesive nanoemulsion for treatment of cerebral ischemia. *Int J Biol Macromol*, v. 88, p. 320-32, 2016.

AJAYI, O.S.; ADEROGBA, M.A.; OBUOTOR, E.M.; MAJINDA, R.R.T. Acetylcholinesterase inhibitor from *Anthocleista vogelii* leaf extracts, *Journal of Ethnopharmacology*, Volume 231, Pages 503-506, 2019.

ALAM, S.; KHAN, Z. I.; MUSTAFA, G.; KUMAR, M.; ISLAM, F.; BHATNAGAR, A.; AHMAD, F. J. Development and evaluation of thymoquinone-encapsulated chitosan nanoparticles for nose-to-brain targeting: a pharmacoscintigraphic study. *Int J Nanomedicine*, v. 7, p. 5705-18, 2012.

ALVAREZ, J.; ALVAREZ-ILLERA, P.; SANTO-DOMINGO, J.; FONTERIZ, R.I.; MONTERO, M. Modeling Alzheimer's Disease in *Caenorhabditis elegans*. *Biomedicines*. 2022 Jan 26;10(2):288.

ALMEIDA, S. P.; MOZOMBITE, D. M. S.; DE MELO FILHO, A. A.; DE ANDRADE LARANJEIRA, A. G.; MARTINS, R. M.; TAKAHASHI, J. A.; ... TADEI, W. P. Chemical composition, antiacetylcholinesterase inhibition and toxicity activities of essential oil from *Hyptis dilatata* (Lamiaceae) flowers. *Journal of Medicinal Plants Research*, 11(14), 275-283, 2017.

AL-NAGAR, N. M., ABOU-TALEB, H. K., SHAWIR, M. S., & ABDELGALEIL, S. A. Comparative toxicity, growth inhibitory and biochemical effects of terpenes and phenylpropenes on *Spodoptera littoralis* (Boisd.). *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 23(1), 67-75, 2020.

AL-NAGAR, N.M.A.; ABOU-TALEB, H.K.; SHAWIR, M.S.; ABDELGALEIL, S.A.M. Comparative toxicity, growth inhibitory and biochemical effects of terpenes and phenylpropenes on *Spodoptera littoralis* (Boisd.), *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 2019.

ALZHEIMER'S ASSOCIATION. Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimer's & Dementia*, v. 15, n. 3, p. 321-387, 2019.

ANDRADE, M. A., DAS GRAÇAS CARDOSO, M., DE ANDRADE, J., SILVA, L. F., TEIXEIRA, M. L., VALÉRIO RESENDE, J. M., ... & BARROSO, J. G. Chemical composition and antioxidant activity of essential oils from *Cinnamodendron dinisii* Schwacke and *Siparuna guianensis* Aublet. *Antioxidants*, 2(4), 384-397, 2013.

ARAÚJO, M.C.; ASSIS, C.R.D.; SILVA, K.C.C.; SOUZA, K. S.; AZEVEDO, R.S.; ALVES, M.H.M.E.; SILVA, L.C.; SILVA, V.L.; ADAM, M.L.; CARVALHO JUNIOR, L.B.; BEZERRA, R.S.; OLIVEIRA, M.B.M. Characterization of brain acetylcholinesterase of bentonic fish *hoplosternum littorale*: perspectives of application in pesticides and metal ions biomonitoring. *Aquatic Toxicology* 205 213–226, 2018.

ASSIS, C.R.D. LINHARES, A.G. OLIVEIRA, V.M. FRANCA, R.C.P. MACIEL CARVALHO, E.V.M. BEZERRA, R.S. CARVALHO, L.B.JR. Comparative effect of pesticides on brain acetylcholinesterase in tropical fish. *Sci Total Environ* 441:141–150, 2012.

ASSIS, M. A.; MORELLI-AMARAL, V. FRANCISCO; PIMENTA, FABRÍCIA P. Research groups and their scientific literature on medicinal plants: an exploratory study in the state of Rio de Janeiro. *Revista Fitos*, Rio de Janeiro, Vol. 9(1): 1-72, Jan-Mar 2015.

AYDIN, M. S.; KOCARSLAN, A.; KOCARSLAN, S.; KUCUK, A.; ESER, I.; SEZEN, H.; BUYUKFIRAT, E.; HAZAR, A. Thymoquinone protects end organs from abdominal aorta ischemia/reperfusion injury in a rat model. *Rev Bras Cir Cardiovasc*, v. 30, n. 1, p. 77-83, 2015.

AZIZ, S. G.; AZIZ, S. G.; AKBARZADEH, A. Advances in Silver Nanotechnology: An Update on Biomedical Applications and Future Perspectives. *Drug Res (Stuttg)*, v. 67, n. 4, p. 198-203, 2017.

BAETEN, K. M.; AKASSOGLU, K. Extracellular matrix and matrix receptors in blood-brain barrier formation and stroke. *Dev Neurobiol*, v. 71, n. 11, p. 1018-39, 2011.

BARBALHO, C. R. S.; VALE, M. M.; MARQUEZ, S. O. M. Metodologia do trabalho científico: normas para a construção de trabalhos acadêmicos. Manaus: EDUA, 2017.

BARBOSA, C. S.; PEREIRA, R.F.; FORTUNA, J. L. Antifungal activity of the essential oil of lemon balm *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown (Verbenaceae) on *Candida albicans*. *Revista Biosciences*, Taubaté, v. 23, N. 1, p. 53-60, 2017.

BARBOSA, H. D., CASTILHO, P. A., SAQUETI, B. H. F., ALVES, E. D. S., & VITAL, A. C. P. Óleos essenciais: aplicações em óleos comestíveis, frutas e revestimentos comestíveis demonstrando atividade antibacteriana e antifúngica, 2019.

BARROS, D.B.S.; SILVA, M.H.M.; SANTOS, R.H.G.; OLIVEIRA, A.F.M. Tempo de extração para óleo essencial de *Croton* spp. (Euphorbiaceae). *Revista Brasileira de Meio Ambiente*, v.3, n.1. 037-040, 2018.

BARROS, J. C.; GARCIA, M. V.; ANDREOTTI, R. Óleo essencial de *Tagetes minuta* como fitoterápico no controle dos carrapatos. Brasília, DF: Embrapa, 240 p. il. Color, 2019.

BHAT S.A.; KAMAL M.A.; YARLA, N.S.; ASHRAF, G.M. Synopsis on Management Strategies for Neurodegenerative Disorders: Challenges from Bench to Bedside in Successful Drug Discovery and Development. *Curr Top Med Chem*. 17(12):1371-1378, 2017.

BEAUMONT, A.; MARMAROU, A.; HAYASAKI, K.; BARZO, P.; FATOUROS, P.; CORWIN, F.; MARMAROU, C.; DUNBAR, J. The permissive nature of blood brain barrier (BBB) opening in edema formation following traumatic brain injury. *Acta Neurochir Suppl*, v. 76, p. 125-9, 2000.

BECHTER, K.; REIBER, H.; HERZOG, S.; FUCHS, D.; TUMANI, H.; MAXEINER, H. G. Cerebrospinal fluid analysis in affective and schizophrenic spectrum disorders: identification of subgroups with immune responses and blood-CSF barrier dysfunction. *J Psychiatr Res*, v. 44, n. 5, p. 321-30, 2010.

BERNOCCHI, B.; CARPENTIER, R.; LANTIER, I.; DUCOURNAU, C.; DIMIER-POISSON, I.; BETBEDER, D. Mechanisms allowing protein delivery in nasal mucosa using NPL nanoparticles. *J Control Release*, v. 232, p. 42-50, 2016.

BISSEL, S. J.; KOFLER, J.; NYAUNDI, J.; MURPHEY-CORB, M.; WISNIEWSKI, S. R.; WILEY, C. A. Cerebrospinal Fluid Biomarkers of Simian Immunodeficiency Virus Encephalitis: CSF Biomarkers of SIV Encephalitis. *J Neuroimmune Pharmacol*, v. 11, n. 2, p. 332-47, 2016.

BOASQUÍVIS P.F.; SILVA G.M.; PAIVA, F.A.; CAVALCANTI, R.M.; NUNEZ, C.V.; DE PAULA, O. R. Extrato de guaraná (*Paullinia cupana*) protege modelos de *Caenorhabditis elegans* para doença de Alzheimer e doença de Huntington através da ativação de vias antioxidantes e de degradação de proteínas. *Medicina Oxidativa e Longevidade Celular*. 4 de julho de 2018, 2018.

BONDY, S. C. Anthropogenic pollutants may increase the incidence of neurodegenerative disease in an aging population. *Toxicology*, v. 341, p. 41-46, 2016.

BORGES, L. P.; AMORIM, V. A. METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DE PLANTAS SECONDARY PLANT METABOLITES. *Revista Agrotecnologia, Ipameri*, v.11, n.1, p.54-67, 2020.

BRADFORD, M.A., Rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye-binding, *Anal. Biochem*. 72, 248-254, 1976.

BREUNIG, M.; BAUER, S.; GOEPFERICH, A. Polymers and nanoparticles: intelligent tools for intracellular targeting? *Eur J Pharm Biopharm*, v. 68, n. 1, p. 112-28, 2008.

BROWN, B. M., PEIFFER, J., & RAINEY-SMITH, S. R. Exploring the relationship between physical activity, beta-amyloid and tau: A narrative review. *Ageing research reviews*, 50, 9-18, 2019.

BUTTERFIELD, D. Allan; HALLIWELL, Barry. Oxidative stress, dysfunctional glucose metabolism and Alzheimer disease. *Nature Reviews Neuroscience*, v. 20, n. 3, p. 148-160, 2019.

C. *ELEGANS* SEQUENCING CONSORTIUM. Genome sequence of the nematode *C. elegans*: a platform for investigating biology. *Science*. 1998 Dec 11;282(5396):8, 2012.

CALDWELL, K. A.; WILLICOTT, C.W.; CALDWELL, G.A. "Modelagem de neurodegeneração em *Caenorhabditis elegans*." *Modelos e Mecanismos de Doenças* 13.10: dmm046110, 2020.

CARDOSO A.D.S.; SANTOS E.G.G.; LIMA A.D.S.; TEMEYER K.B.; Pérez de León A.A.; COSTA L.M.; JUNIOR, SOARES A.M.D.S. Terpenes on *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus*: Acaricidal activity and acetylcholinesterase inhibition. *Veterinary Parasitology* 280, 109090, 2020.

CARRADORI, D.; EYER, J.; SAULNIER, P.; PREAT, V.; DES RIEUX, A. The therapeutic contribution of nanomedicine to treat neurodegenerative diseases via neural stem cell differentiation. *Biomaterials*, v. 123, p. 77-91, 2017.

CARTAXO, S. L.; SOUZA, M. M.; DE ALBUQUERQUE, U. P. Medicinal plants with bioprospecting potential used in semi-arid northeastern Brazil. *J Ethnopharmacol*, v. 131, n. 2, p. 326-42, 2010.

CARVALHO, A.M.S.; HEIMFARTH, L. SANTOS, K.A.; GUIMARAES, A.G.; PICOT, L.; ALMEIDA, J.R.G.S.; QUINTANS, J.S.S.; QUINTANS-JUNIOR, L.J. Terpenes as possible drugs for the mitigation of arthritic symptoms - a systematic review, *Phytomedicine*, 2018.

CASTELLANI, RJ, PLASCENCIA-VILLA, G., & PERRY, G. A cascata de amilóide e a terapêutica da doença de Alzheimer: teoria versus observação. *Laboratory Investigation*, 99 (7), 958-970, 2019.

CHAN, W. W.; CHHOWALLA, M.; GLOTZER, S.; GOGOTSI, Y.; HAFNER, J. H.; HAMMOND, P. T.; KOTOV, N. A. Nanoscience and nanotechnology impacting diverse fields of science, engineering, and medicine. (2016).

CHENG, K. K.; CHAN, P. S.; FAN, S.; KWAN, S. M.; YEUNG, K. L.; WANG, Y. X.; CHOW, A. H.; WU, E. X.; BAUM, L. Curcumin-conjugated magnetic nanoparticles for detecting amyloid plaques in Alzheimer's disease mice using magnetic resonance imaging (MRI). *Biomaterials*, v. 44, p. 155-72, 2015.

CHEN X.Y.; LIAO D.C.; SUN M.L.; CUI X.H., WANG H.B. O óleo essencial de *Acorus tatarinowii* Schott melhora a toxicidade induzida por A $\beta$  em *Caenorhabditis elegans* através de uma via de autofagia. *Medicina oxidativa e longevidade celular*. 22 de dezembro de 2020, 2020.

COSTA, A. C.; BRANDAO, H. M.; DA SILVA, S. R.; BENTES-SOUSA, A. R.; DINIZ, J. A., JR.; VIANA PINHEIRO JDE, J.; DE MELO MDE, F.; SILVA, J. O., JR.; MATOS, E. R.; RIBEIRO-COSTA, R. M. Mucoadhesive nanoparticles: a new perspective for fish drug application. *J Fish Dis*, v. 39, n. 4, p. 503-6, 2016.

COSTA, J. O.; VÁSQUEZ, C. M. P.; SANTANA, G. J.; SILVA, N. J.; BRAZ, J. M.; JESUS, A. M.; SILVA, D. G.; CUNHA, L. C. S.; K. B. F. BARBOSA. "Capacidade antioxidante total do

plasma e risco cardiometabólico em adultos jovens não obesos e clinicamente saudáveis". *Arquivos Brasileiros de Cardiologia* 109: 140-147, 2017.

COUVREUR, P.; VAUTHIER, C. Nanotechnology: intelligent design to treat complex disease. *Pharm Res*, v. 23, n. 7, p. 1417-50, 2006.

COZZOLINO, D. Near infrared spectroscopy in natural products analysis. *Planta Med*, v. 75, n. 7, p. 746-56, 2009.

CREWS, L.; MASLIAH, E. Molecular mechanisms of neurodegeneration in Alzheimer's disease, *Human Molecular Genetics*, Volume 19, Issue R1, 15 April 2010, Pages R12–R20, 2010.

DA MOTA JUNIOR, V. D.; RIBEIRO, F. C.; DE LIMA, F. A.; RIBEIRO, A. I. Proteção da biodiversidade, legislação e políticas públicas na região metropolitana de Sorocaba-SP, Brasil, entre 2010 e 2019.

DA SILVA-CANDAL, A.; ARGIBAY, B.; IGLESIAS-REY, R.; VARGAS, Z.; VIEITES-PRADO, A.; LOPEZ-ARIAS, E.; RODRIGUEZ-CASTRO, E.; LOPEZ-DEQUIDT, I.; RODRIGUEZ-YANEZ, M.; PINEIRO, Y.; SOBRINO, T.; CAMPOS, F.; RIVAS, J.; CASTILLO, J. Vectorized nanodelivery systems for ischemic stroke: a concept and a need. *J Nanobiotechnology*, v. 15, n. 1, p. 30, 2017.

DALMAGRO, A. P.; CAZARIN, C. A.; DOS SANTOS ZENAIDE, F. Atualização no estudo das bases bioquímicas e moleculares da doença de Alzheimer/An update about the biochemical and molecular basis of Alzheimer's disease. *Brazilian Applied Science Review*, 4(1), 118-130, 2020.

DANHIER, F.; ANSORENA, E.; SILVA, J. M.; COCO, R.; LE BRETON, A.; PREAT, V. PLGA-based nanoparticles: an overview of biomedical applications. *J Control Release*, v. 161, n. 2, p. 505-22, 2012.

DAWSON, TED M.; GOLDE, TODD E.; LAGIER-TOURENNE, CLOTILDE. Animal models of neurodegenerative diseases. *Nature neuroscience*, v. 21, n. 10, p. 1370-1379, 2018.

DE ALMEIDA, E.M.; FERREIRA, H.J.; ALVES, D.R.; DA SILVA, W.M.B. Potencial terapêutico de plantas medicinais indicado pelo sistema público de saúde no tratamento dos efeitos colaterais induzidos por quimioterapia, radioterapia e quimiorradioterapia: uma revisão sistemática. *Terapias complementares em medicina*, 102293, 2020.

DE ALMEIDA, W.; DE ANDRADE, J.P.; CHACON, D.S.; LUCAS, C.R.; MARIANA, E.; DE SANTIS, F. L.; GUARATINI, T.; BARBOSA, E.G.; ZUANAZZI, J.A.; HALLWASS, F.; DE SOUZA, B. W.; DE PAULA, O. R.; GIORDANI, R.B. Isoquinoline alkaloids reduce beta-amyloid peptide toxicity in *Caenorhabditis elegans*. *Nat Prod Res*. 2021 Nov;35(22):4814-4818, 2021.

DE LANGE, E. C. The physiological characteristics and transcytosis mechanisms of the blood-brain barrier (BBB). *Curr Pharm Biotechnol*, v. 13, n. 12, p. 2319-27, 2012.

DE REZENDE, F. M.; ROSADO, D.; MOREIRA, F. A.; DE CARVALHO, W. R. S. Vias de síntese de metabólitos secundários em plantas. *Laboratório de Ensino de Botânica*, 93, 2016.

DE SOUZA MARCONE, G. P. Nanotecnologia e nanociência: aspectos gerais, aplicações e perspectivas no contexto do Brasil. *Revista Eletrônica Perspectivas da Ciência e Tecnologia-ISSN: 1984-5693*, 7(2), 1, 2016.

DEY, A.; BHATTACHARYA, R.; MUKHERJEE, A.; PANDEY, D. K. Natural products against Alzheimer's disease: Pharmacotherapeutics and biotechnological interventions. *Biotechnology advances*, 35(2), 178-216, 2017.

DING, S.; KHAN, A. I.; CAI, X.; SONG, Y.; LYU, Z.; DU, D.; LIN, Y. Overcoming blood-brain barrier transport: Advances in nanoparticle-based drug delivery strategies. *Materials Today*, 2020.

DONALD, D. L. *C. elegans* II. New York, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press., 1997.

DOURLEN, P., KILINC, D., MALMANCHE, N., CHAPUIS, J., & LAMBERT, J. C. The new genetic landscape of Alzheimer's disease: from amyloid cascade to genetically driven synaptic failure hypothesis? *Acta neuropathologica*, 1-16, 2019.

DUAN, Y.; ZHANG, Z.; TANG, Y.; LIN, Y. [Preparation and degradation behavior of PELGE nanoparticles]. *Sheng Wu Yi Xue Gong Cheng Xue Za Zhi*, v. 21, n. 6, p. 921-5, 2004.

ELDUFANI, J.; BLAISE, G. The role of acetylcholinesterase inhibitors such as neostigmine and rivastigmine on chronic pain and cognitive function in aging: A review of recent clinical applications. *Alzheimer's & Dementia: Translational Research & Clinical Interventions*, 5, 175-183, 2019.

EL-SEEDI, H. R.; KHALIL, N. S.; AZEEM, M.; TAHER, E. A.; GORANSSON, U.; PALSSON, K.; BORG-KARLSON, A. K. Chemical composition and repellency of essential oils from four medicinal plants against *Ixodes ricinus* nymphs (Acari: Ixodidae). *J Med Entomol*, v. 49, n. 5, p. 1067-75, 2012.

FAGAN, A. M.; HOLTZMAN, D. M. Cerebrospinal fluid biomarkers of Alzheimer's disease. *Biomark Med*, v. 4, n. 1, p. 51-63, 2010.

FALCO, A. CUKIERMAN, D. S. HAUSER-DAVIS, R. A. REY, N. A. Doença de Alzheimer: hipóteses etiológicas e perspectivas de tratamento. *Química Nova*, Vol. 39, No. 1, 63-80, 2016.

FAO. Food and Agriculture Organization. Pesticides in food report. FAO plant production and protection paper 191. Rome, 2007.

FELIPE, L. O.; BICAS, J. L. Terpenos, aromas e a química dos compostos naturais. *Química e Sociedade*, v. 39, p. 120-130, 2017.

FESSI, H. P. F. D., PUISIEUX, F., DEVISSAGUET, J. P., AMMOURY, N., & BENITA, S. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. *International journal of pharmaceutics*, 55(1), R1-R4, 1989.

FERREIRA, T.P.; HADDI, K.; CORRÊA, R.F.T.; ZAPATA V.L.; PIAU, T.B.; SOUZA, L.F.; SANTOS, S.M.; OLIVEIRA, E.E.; JUMBO, L.O.; RIBEIRO, B.M.; GRISOLIA, C.K. Prolonged mosquitocidal activity of Siparuna guianensis essential oil encapsulated in chitosan nanoparticles. *PLoS neglected tropical diseases*. 2019 Aug 9;13(8): e0007624, 2019.

FERREIRA, R.M.; D'HAVELOOSE, N.P.; CRUZ, R.A.; ARAÚJO, R.S.; CARVALHO, J.C.; ROCHA, L.; FERNANDES, L.P.; DA COSTA, T.S.; FERNANDES, C.P.; SOUTO, R.N. Nanoemulsification enhances the larvicidal potential of the essential oil of Siparuna guianensis (Laurales: Siparunaceae) against Aedes (Stegomyia) aegypti (Diptera: Culicidae). *Journal of Medical Entomology*. 2020 May 4;57(3):788-96, 2020.

FIALKOSKI, D.; MALFATTI, C. R. M. Nanotecnologia: uma prospecção tecnológica no âmbito nacional e internacional. *Cadernos de Prospecção*, 12(3), 590, 2019.

FIGUEREDO, C. A. D.; GURGEL, I. G. D.; GURGEL JUNIOR, G. D. A Política Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos: construção, perspectivas e desafios. *Physis: Revista de Saúde Coletiva*, 24, 381-400, 2014.

FILOCREÃO, A. S. M.; GALINDO, A. G. G.; SANTOS, T. J. S. Phytotherapy in the Amazon: the experience of Amapá-Brazil. In: Cassiolato, J. E.; Soares, M. C. C. (Org.). *Health Innovation Systems: Equity and Development*. Rio de Janeiro: E-papers, p. 321-354, 2015.

FIRMO, W.C.A.; MENEZES, V.J.M.; PASSOS, C.E.C.; DIAS, C.N.; ALVES, L.P.L.; DIAS, I.C.L.; NETO, M.S.; OLEA, R.S.G. Contexto histórico, uso popular e concepção científica sobre plantas medicinais. *Cad. Pesq.*, São Luís, v. 18, n. especial, dez. 2011.

FLORA DO BRASIL 2020 EM CONSTRUÇÃO. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/>>. Acesso em: 03 out. 2020.

FONSECA-SANTOS, B.; GREMIAO, M. P.; CHORILLI, M. Nanotechnology-based drug delivery systems for the treatment of Alzheimer's disease. *Int J Nanomedicine*, v. 10, p. 4981-5003, 2015.

FREITAS, J. N.; GONCALVES, A. S.; NOGUEIRA, A. F. A comprehensive review of the application of chalcogenide nanoparticles in polymer solar cells. *Nanoscale*, v. 6, n. 12, p. 6371-97, 2014.

FU, H.; HARDY, J.; DUFF, K. E. Selective vulnerability in neurodegenerative diseases. *Nature neuroscience*, v. 21, n. 10, p. 1350-1358, 2018.

FUENTES C.; VERDÚ S.; FUENTES A.; RUIZ M.J.; BARAT J.M. Effects of essential oil components exposure on biological parameters of Caenorhabditis elegans. *Food and Chemical Toxicology*. 2022 Jan 1; 159:112763, 2022.

FUJIWARA, M.; YAGI, N.; MIYAZAWA, M. Acetylcholinesterase inhibitory activity of volatile oil from *Peltophorum dasyrachis* Kurz ex Bakar (yellow batai) and bisabolane-type sesquiterpenoids. *Journal of agricultural and food chemistry*, 58(5), 2824-2829, 2010.

GALLARDO, G.; HOLTZMAN, D.M. Amyloid- $\beta$  e Tau na encruzilhada da doença de Alzheimer. In *Tau Biology* (pp. 187-203). Springer, Singapura, 2019.

GANDHI, G. R., VASCONCELOS, A. B. S., HARAN, G. H., DA SILVA CALISTO, V. K., JOTHI, G., QUINTANS, J. D. S. S., ... & GURGEL, R. Q. Essential oils and its bioactive compounds modulating cytokines: A systematic review on anti-asthmatic and immunomodulatory properties. *Phytomedicine. e*, 152854. 2019.

GANESAN, P.; KO, H. M.; KIM, I. S.; CHOI, D. K. Recent trends in the development of nanophytobioactive compounds and delivery systems for their possible role in reducing oxidative stress in Parkinson's disease models. *Int J Nanomedicine*, v. 10, p. 6757-72, 2015.

GANESH, P.S.; RAI, R.V. Inhibition of quorum-sensing-controlled virulence factors of *Pseudomonas aeruginosa* by *Murraya koenigii* essential oil: a study in a *Caenorhabditis elegans* infectious model. *J Med Microbiol*. 2016

GAO, K.; JIANG, X. Influence of particle size on transport of methotrexate across blood brain barrier by polysorbate 80-coated polybutylcyanoacrylate nanoparticles. *Int J Pharm*, v. 310, n. 1-2, p. 213-9, 2006.

GAO M, LONG X, DU J, TENG M, ZHANG W, WANG Y, WANG X, WANG Z, ZHANG P, LI J. Enhanced curcumin solubility and antibacterial activity by encapsulation in PLGA oily core nanocapsules. *Food & Function*. 11(1):448-55, 2020.

GECHEV, T. S.; HILLE, J.; WOERDENBAG, H. J.; BENINA, M.; MEHTEROV, N.; TONEVA, V.; FERNIE, A. R.; MUELLER-ROEBER, B. Natural products from resurrection plants: potential for medical applications. *Biotechnol Adv*, v. 32, n. 6, p. 1091-101, 2014.

GEHLEN, M. H. The centenary of the Stern-Volmer equation of fluorescence quenching: From the single line plot to the SV quenching map. *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews*, 42, 100338, 2020.

GHISONI, K.; LATINI, A. Kuehne LK, Reiber H, Bechter K, Hagberg L, Fuchs D., Cerebrospinal fluid neopterin is brain-derived and not associated with blood-CSF barrier dysfunction in non-inflammatory affective and schizophrenic spectrum disorders. *Journal of Psychiatric Research*, Volume 47, Issue 10, October 2013, pages 1417-1422. *J Psychiatr Res*, v. 63, p. 141-2, 2015.

GIACOMELLI, C.; DANIELE, S.; MARTINI, C. Potential biomarkers and novel pharmacological targets in protein aggregation-related neurodegenerative diseases. *Biochem Pharmacol*, v. 131, p. 1-15, 2017.

GOMES, M. J.; NEVES, J.; SARMENTO, B. Nanoparticle-based drug delivery to improve the efficacy of antiretroviral therapy in the central nervous system. *Int J Nanomedicine*, v. 9, p. 1757-69, 2014.

GONDIM, B. L.; DA SILVA CATARINO, J.; DE SOUSA, M. A. D.; DE OLIVEIRA SILVA, M.; LEMES, M. R.; DE CARVALHO-COSTA, T. M.; ... CANCADO CASTELLANO, L. R. Nanoparticle-mediated drug delivery: blood-brain barrier as the main obstacle to treating infectious diseases in CNS. *Current Pharmaceutical Design*, 25(37), 3983-3996, 2019.

GRIEP, L. M.; WOLBERS, F.; DE WAGENAAR, B.; TER BRAAK, P. M.; WEKSLER, B. B.; ROMERO, I. A.; COURAUD, P. O.; VERMES, I.; VAN DER MEER, A. D.; VAN DEN BERG, A. BBB on chip: microfluidic platform to mechanically and biochemically modulate blood-brain barrier function. *Biomed Microdevices*, v. 15, n. 1, p. 145-50, 2013.

GUNASEKARAN, T.; HAILE, T.; NIGUSSE, T.; DHANARAJU, M. D. Nanotechnology: an effective tool for enhancing bioavailability and bioactivity of phytomedicine. *Asian Pac J Trop Biomed*, v. 4, n. Suppl 1, p. S1-7, 2014.

HAMPEL, H., MESULAM, MM, CUELLO, AC, KHACHATURIAN, AS, VERGALLO, A., FARLOW, MR, ALZHEIMER PRECISION MEDICINE INITIATIVE. Revisitando a hipótese colinérgica na doença de Alzheimer: evidências emergentes de pesquisas translacionais e clínicas. *O jornal de prevenção da doença de Alzheimer*, 6 (1), 2-15, 2019.

HAN, L.; FU, Y.; COLE, A. J.; LIU, J.; WANG, J. Co-encapsulation and sustained-release of four components in ginkgo terpenes from injectable PELGE nanoparticles. *Fitoterapia*, v. 83, n. 4, p. 721-31, 2012.

HANSON, L. R.; FREY, W. H., 2ND. Intranasal delivery bypasses the blood-brain barrier to target therapeutic agents to the central nervous system and treat neurodegenerative disease. *BMC Neurosci*, v. 9 Suppl 3, p. S5, 2008.

HARA, Y.; MCKEEHAN, N.; FILLIT, H. M. Translating the biology of aging into novel therapeutics for Alzheimer disease. *Neurology*, 92(2), 84-93, 2019.

HENSTRIDGE, C. M.; HYMAN, B. T. & SPIRES-JONES, T. L. Beyond the neuron–cellular interactions early in Alzheimer disease pathogenesis. *Nature Reviews Neuroscience*, 20(2), 94-108, 2019.

HENSTRIDGE, CM, HYMAN, BT e SPIERS-JONES, T.L. Beyond the neuron–cellular interactions early in Alzheimer disease pathogenesis. *Nature Reviews Neuroscience*. 20, 94-108, 2019.

HERRERA, M.L.; FALOMIR-LOCKHART, E.; DOLCETTI, F.J.C.; ARNAL, N.; BELLINI, M.J.; HERENÚ C.B. Implication of Oxidative Stress, Aging, and Inflammatory Processes in Neurodegenerative Diseases: Growth Factors as Therapeutic Approach. In: Gargiulo P., Mesones Arroyo H. (eds) *Psychiatry and Neuroscience Update*. Springer, Cham, 2019.

HOFF, D.; SHEIKH, L.; BHATTACHARYA, S.; NAYAR, S.; WEBSTER, T. J. Comparison study of ferrofluid and powder iron oxide nanoparticle permeability across the blood-brain barrier. *Int J Nanomedicine*, v. 8, p. 703-10, 2013.

HUANG, H., GE, B., ZHANG, S., LI, J., SUN, C., YUE, T., & HUANG, F. Using Fluorescence Quenching Titration to Determine the Orientation of a Model Transmembrane Protein in Mimic Membranes. *Materials*, v. 12, n. 3, p. 349, 2019.

IZQUIERDO P.G.; O'CONNOR V.; GREEN A.C.; HOLDEN-DYE L. TATTERSALL J.E. *C. elegans* pharyngeal pumping provides a whole organism bio-assay to investigate anti-cholinesterase intoxication and antidotes. *Neurotoxicology*. 2021 Jan 1; 82:50-62, 2021.

IVANOVIĆ, M.; MAKOTER, K.; RAZBORŠEK, M. I. "Comparative study of chemical composition and antioxidant activity of essential oils and crude extracts of four characteristic Zingiberaceae herbs." *Plants* 10, no. 3: 501, 2021.

JAFARIEH, O.; MD, S.; ALI, M.; BABOOTA, S.; SAHNI, J. K.; KUMARI, B.; BHATNAGAR, A.; ALI, J. Design, characterization, and evaluation of intranasal delivery of ropinirole-loaded mucoadhesive nanoparticles for brain targeting. *Drug Dev Ind Pharm*, v. 41, n. 10, p. 1674-81, 2015.

JAROONWITCHAWAN, T.; CHAICHAROENAUDOMRUNG, N.; NAMKAEW, J.; NOISA, P. Curcumin attenuates paraquat-induced cell death in human neuroblastoma cells through modulating oxidative stress and autophagy. *Neurosci Lett*, v. 636, p. 40-47, 2017.

JUKKOLA, P.; GUERRERO, T.; GRAY, V.; GU, C. Astrocytes differentially respond to inflammatory autoimmune insults and imbalances of neural activity. *Acta Neuropathol Commun*, v. 1, p. 70, 2013.

KAKKAR, V.; MUPPU, S. K.; CHOPRA, K.; KAUR, I. P. Curcumin loaded solid lipid nanoparticles: an efficient formulation approach for cerebral ischemic reperfusion injury in rats. *Eur J Pharm Biopharm*, v. 85, n. 3 Pt A, p. 339-45, 2013.

KALETTA T.; HENGARTNER M.O. Finding function in novel targets: *C. elegans* as a model organism. *Nat Rev Drug Discov*. 2006 May;5(5):387-98, 2006.

KALINNIKOVA T.B.; SHAGIDULLIN R.R.; KOLSANOVA R.R.; OSIPOVA E.B.; ZAKHAROV S.V.; GAINUTDINOV M.K. A deficiência de acetilcolina em *Caenorhabditis elegans* induzida por hipertermia pode ser compensada pela inibição da ACh-esterase ou ativação de GAR-3 mAChRs. *Meio Ambiente e Pesquisa de Recursos Naturais*. 1 de setembro de 2013;3(3):98, 2013.

KANGWANTAS, K.; PINTEAUX, E.; PENNY, J. The extracellular matrix protein laminin-10 promotes blood-brain barrier repair after hypoxia and inflammation in vitro. *J Neuroinflammation*, v. 13, p. 25, 2016.

KNOPMAN, D.S.; AMIEVA, H.; PETERSEN, R.C.; CHÉTELAT, G.; HOLTZMAN, D.M.; HYMAN, B.T.; NIXON, R.A.; JONES, D.T. Alzheimer disease. *Nature reviews Disease primers*. May 13;7(1):1-21, 2021.

KANWAR, J. R.; SRIRAMOJU, B.; KANWAR, R. K. Neurological disorders and therapeutics targeted to surmount the blood-brain barrier. *Int J Nanomedicine*, v. 7, p. 3259-78, 2012.

KARAKAYA, S.; YILMAZ, S. V.; KOCA, M.; DEMIRCI, B.; SYTAR, O. Screening of non-alkaloid acetylcholinesterase inhibitors from extracts and essential oils of *Anthriscus nemorosa* (M. Bieb.) Spreng. (Apiaceae). *South African Journal of Botany*, 125, 261-269, 2019.

KARAMI, Z., ZANJANI, M. R. S., & HAMIDI, M. (2019). Nanoemulsions in CNS drug delivery: recent developments, impacts and challenges. *Drug discovery today*, 24(5), 1104-1115.

KEPP, K. P. Alzheimer's disease: How metal ions define  $\beta$ -amyloid function. *Coordination Chemistry Reviews*, 351, 127-159, 2017.

KOLA, S. M.; KUMAR, P.; CHOONARA, Y. E.; DU TOIT, L. C.; PILLAY, V. Hypothesis: Can drug-loaded platelets be used as delivery vehicles for blood-brain barrier penetration? *Medical hypotheses*, 125, 75-78, 2019.

KUEHNE, L. K.; REIBER, H.; BECHTER, K.; HAGBERG, L.; FUCHS, D. Cerebrospinal fluid neopterin is brain-derived and not associated with blood-CSF barrier dysfunction in non-inflammatory affective and schizophrenic spectrum disorders. *J Psychiatr Res*, v. 47, n. 10, p. 1417-22, 2013.

KULKARNI, A. D.; VANJARI, Y. H.; SANCHETI, K. H.; BELGAMWAR, V. S.; SURANA, S. J.; PARDESHI, C. V. Nanotechnology-mediated nose to brain drug delivery for Parkinson's disease: a mini review. *J Drug Target*, v. 23, n. 9, p. 775-88, 2015.

KULKARNI, S. K. *Nanotechnology: principles and practices*. Springer, 2014.

KUMAR, M.; MOHANTY, S.; NAYAK, S. K.; RAHAIL PARVAIZ, M. Effect of glycidyl methacrylate (GMA) on the thermal, mechanical and morphological property of biodegradable PLA/PBAT blend and its nanocomposites. *Bioresour Technol*, v. 101, n. 21, p. 8406-15, 2010.

KUMARI, P.; LUQMAN, S.; MEENA, A. "Aplicação das abordagens combinatórias de plantas medicinais e aromáticas com nanotecnologia e seus impactos na saúde." *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences* 27.1: 475-489, 2019.

KUO, R.; SAITO, E.; MILLER, S. D.; SHEA, L. D. Peptide-Conjugated Nanoparticles Reduce Positive Co-stimulatory Expression and T Cell Activity to Induce Tolerance. *Mol Ther*, 2017.

LAKOWICZ, J R. *Principles of fluorescence spectroscopy*. Springer Science & Business Media, 2013.

LAKOWICZ, J. R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. 3a ed. New York: Springer, 2006.

LEI, P.; AYTON, S.; BUSH, A. I. The essential elements of Alzheimer's disease. *The Journal of biological chemistry*, 296, 100105, 2021.

LI, W.; LIN, L.; ZHANG, M.; WU, Y.; LIU, C.; LI, X.; HUANG, S.; LIANG, C.; WANG, Y.; CHEN, J.; FENG, W. Safety and Preliminary Efficacy of Early Tirofiban Treatment After Alteplase in Acute Ischemic Stroke Patients. *Stroke*, v. 47, n. 10, p. 2649-51, 2016.

LIANG, J. J.H.; MCKINNON, I.A.; RANKIN, C.H. "A contribuição da neurogenética *C. elegans* para a compreensão de doenças neurodegenerativas." *Journal of Neurogenetics* 34, não. 3-4: 527-548, 2020.

LIANG, R.; ZHU, J. Monodisperse PLA/PLGA nanoparticle fabrication through a surfactant-free route. *J Control Release*, v. 152 Suppl 1, p. e129-31, 2011.

LIANG, S. H.; SOUTHON, A. G.; FRASER, B. H.; KRAUSE-HEUER, A. M.; ZHANG, B.; SHOUP, T. M.; ... BUSH, A. I. Novel fluorinated 8-hydroxyquinoline based metal ionophores for exploring the metal hypothesis of Alzheimer's disease. *ACS medicinal chemistry letters*, 6(9), 1025-1029, 2015.

LIAO, L.; ZHANG, M.; LIU, H.; ZHANG, X.; XIE, Z.; ZHANG, Z.; GONG, T.; SUN, X. Subchronic toxicity and immunotoxicity of MeO-PEG-poly(D,L-lactic-co-glycolic acid)-PEG-OMe triblock copolymer nanoparticles delivered intravenously into rats. *Nanotechnology*, v. 25, n. 24, p. 245705, 2014.

LIU, Y.; WU, X.; MI, Y.; ZHANG, B.; GU, S.; LIU, G.; LI, X. PLGA nanoparticles for the oral delivery of niferetin: preparation, physicochemical characterization and in vitro/in vivo studies. *Drug Deliv*, v. 24, n. 1, p. 443-451, 2017.

LONG J.M.; HOLTZMAN D.M. Doença de Alzheimer: uma atualização sobre patologia e estratégias de tratamento. *Célula*. 179(2):312-39, 2019.

LÓPEZ, V., PAVELA, R., GÓMEZ-RINCÓN, C., LES, F., BARTOLUCCI, F., GALIFFA, V., ... & OTRANTO, D. Eficácia do óleo essencial de *Origanum syriacum* contra o vetor do mosquito *Culex quinquefasciatus* e o parasita gastrointestinal *Anisakis simplex*, com informações sobre a inibição da acetilcolinesterase. *Molecules*, 24 (14), 2563, 2019.

LUO J.; CHEN S.; MIN S.; Peng L. Reevaluation and update on efficacy and safety of neostigmine for reversal of neuromuscular blockade. *Therapeutics and Clinical Risk Management*. 14:2397, 2018.

MA, L.; ZHAO, Y.; CHEN, Y.; CHENG, B.; Anlin PENG, A.; HUANG, K. "Caenorhabditis elegans como um sistema modelo para identificação de alvos e triagem de drogas contra doenças neurodegenerativas." *Jornal Europeu de Farmacologia* 819: 169-180, 2018.

MAEDA, S.; TAKASHIMA, A. Tau Oligômeros. In *Tau Biology*. Springer, Singapura, pp. 373-380, 2019.

MAHRINGER, A.; FRICKER, G. ABC transporters at the blood-brain barrier. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, v. 12, n. 5, p. 499-508, 2016.

MARCIANES, P.; NEGRO, S.; GARCIA-GARCIA, L.; MONTEJO, C.; BARCIA, E.; FERNANDEZ-CARBALLIDO, A. Surface-modified gatifloxacin nanoparticles with potential for treating central nervous system tuberculosis. *Int J Nanomedicine*, v. 12, p. 1959-1968, 2017.

MARIANECCI, C.; RINALDI, F.; HANIEH, P. N.; DI MARZIO, L.; PAOLINO, D.; CARAFA, M. Drug delivery in overcoming the blood-brain barrier: role of nasal mucosal grafting. *Drug Des Devel Ther*, v. 11, p. 325-335, 2017.

MARMITT, D.J.; BITENCOURT, S.; SILVA, A.C.; REMPEL, C.; GOETTERT, M.I. The healing properties of medicinal plants used in the Brazilian public health system: a systematic review. *JOURNAL OF WOUND CARE WUWHS SUPPLEMENT*, Vol. 27, n.6, June 2018.

MARTINS, A. R. Representation of the reversible enzymatic inhibition effect for the kinetic model of Michaelis-Menten in transient state. *Braz. J. Food Technol., Campinas*, v. 18, n. 2, p. 112-120, abr./jun. 2015.

MARTINS, Regildo Max Gomes. Composição química e atividade biológica do óleo essencial de *Siparuna guianensis* Aublet (Siparunaceae). Dissertação de mestrado. 2016.

MARTINS, R.M.G.; XAVIER-JÚNIOR F.H.; BARROS M.R.; MENEZES T.M.; DE ASSIS C.R.; DE MELO A.C., VERAS B.O.; FERRAZ V.P.; ANTONIO FILHO A.M.; YOGUI G.T.; BEZERRA R.S. Impact on cholinesterase inhibition and in silico investigations of sesquiterpenoids from the Amazon *Siparuna guianensis* Aubl. *Spectrochimica Acta Parte A: Espectroscopia Molecular e Biomolecular*. 5 de maio de 2021; 252:119511, 2021.

MAY, J. N., GOLOMBEK, S. K., BAUES, M., DASGUPTA, A.; DRUDE, N.; RIX, A.; ... PECHAR, M. Multimodal and multiscale optical imaging of nanomedicine delivery across the blood-brain barrier upon sonopermeation. *Theranostics*, 10(4), 1948, 2020.

MAZON, J. N.; DE MELLO, A. H.; FERREIRA, G. K.; REZIN, G. T. The impact of obesity on neurodegenerative diseases. *Life sciences*, 182, 22-28, 2017.

MD, S.; HAQUE, S.; FAZIL, M.; KUMAR, M.; BABOOTA, S.; SAHNI, J. K.; ALI, J. Optimised nanoformulation of bromocriptine for direct nose-to-brain delivery: biodistribution, pharmacokinetic and dopamine estimation by ultra-HPLC/mass spectrometry method. *Expert Opin Drug Deliv*, v. 11, n. 6, p. 827-42, 2014.

MD, S.; KHAN, R. A.; MUSTAFA, G.; CHUTTANI, K.; BABOOTA, S.; SAHNI, J. K.; ALI, J. Bromocriptine loaded chitosan nanoparticles intended for direct nose to brain delivery: pharmacodynamic, pharmacokinetic and scintigraphy study in mice model. *Eur J Pharm Sci*, v. 48, n. 3, p. 393-405, 2013.

MEDEIROS, S. R.; DE MELO FILHO, A. A.; DA COSTA, H. N.; DOS SANTOS SILVA, F.; DOS SANTOS, R. C.; TAKAHASHI, J. A.; KAMEZAKI, A. K. Chemical profile, antimicrobial

activity, toxicity on *Artemia salina* and anti-acetylcholinesterase enzyme essential oil from *Bauhinia unguolata* L. (Fabaceae) leaves. *Journal of Medicinal Plants Research*, 10(29), 442-449, 2016.

MENEZES, T. M., DE ALMEIDA, S. M. V., DE MOURA, R. O., SEABRA, G., DE LIMA, M. D. C. A., & NEVES, J. L. Spiro-acridine inhibiting tyrosinase enzyme: Kinetic, protein-ligand interaction and molecular docking studies. *International journal of biological macromolecules*, 122, 289-297, 2019.

MICIELI, G.; MARCHESELLI, S.; TOSI, P. A. Safety and efficacy of alteplase in the treatment of acute ischemic stroke. *Vasc Health Risk Manag*, v. 5, n. 1, p. 397-409, 2009.

MILLER, D. S. Regulation of ABC transporters at the blood-brain barrier. *Clin Pharmacol Ther*, v. 97, n. 4, p. 395-403, 2015.

MISRA, A.; GANESH, S.; SHAHIWALA, A.; SHAH, S. P. Drug delivery to the central nervous system: a review. *J Pharm Pharm Sci*, v. 6, n. 2, p. 252-73, 2003.

MISTRY, A.; STOLNIK, S.; ILLUM, L. Nose-to-Brain Delivery: Investigation of the Transport of Nanoparticles with Different Surface Characteristics and Sizes in Excised Porcine Olfactory Epithelium. *Mol Pharm*, v. 12, n. 8, p. 2755-66, 2015.

MITRA, R. N.; CONLEY, S. M.; NAASH, M. I. Therapeutic Approach of Nanotechnology for Oxidative Stress Induced Ocular Neurodegenerative Diseases. *Adv Exp Med Biol*, v. 854, p. 463-9, 2016.

MODI, G.; PILLAY, V.; CHOONARA, Y. E. Advances in the treatment of neurodegenerative disorders employing nanotechnology. *Ann N Y Acad Sci*, v. 1184, p. 154-72, 2010.

MOINARD-CHECOT, D.; CHEVALIER, Y.; BRIANCON, S.; FESSI, H.; GUINEBRETIERE, S. Nanoparticles for drug delivery: review of the formulation and process difficulties illustrated by the emulsion-diffusion process. *J Nanosci Nanotechnol*, v. 6, n. 9-10, p. 2664-81, 2006.

MONTEIRO, J. M.; RAMOS, M. A.; ARAUJO EDE, L.; AMORIM, E. L.; ALBUQUERQUE, U. P. Dynamics of medicinal plants knowledge and commerce in an urban ecosystem (Pernambuco, Northeast Brazil). *Environ Monit Assess*, v. 178, n. 1-4, p. 179-202, 2011.

MORA-HUERTAS, C. E.; FESSI, H.; ELAISSARI, A. Polymer-based nanocapsules for drug delivery. *Int J Pharm*, v. 385, n. 1-2, p. 113-42, 2010.

MORADI, S.Z.; MOMTAZ, S.; BAYRAMI, Z.; FARZAEI, M.H.; ABDOLLAHI, M. Nanoformulations of herbal extracts in treatment of neurodegenerative disorders. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*. 2020 Apr 7; 8:238, 2020.

MORISSO, F. D. P. DALOSTO, J. V. Nanociência e nanotecnologia: um rompimento de paradigmas. *Impactos Sociais e Jurídicos das Nanotecnologias. São Leopoldo: Casa Leiria*, 13-37, 2017.

MU, Y.; LI, L.; HU, S. Q. Molecular inhibitory mechanism of triclin on tyrosinase. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 107, 235–240, 2013.

MULIK, R. S.; MONKKONEN, J.; JUVONEN, R. O.; MAHADIK, K. R.; PARADKAR, A. R. ApoE3 mediated poly(butyl) cyanoacrylate nanoparticles containing curcumin: study of enhanced activity of curcumin against beta amyloid induced cytotoxicity using in vitro cell culture model. *Mol Pharm*, v. 7, n. 3, p. 815-25, 2010.

MULLANE, K.; WILLIAMS, M. Alzheimer's disease (AD) therapeutics – 1: Repeated clinical failures continue to question the amyloid hypothesis of AD and the current understanding of AD causality. *Biochemical pharmacology*, 158, 359-375, 2018.

NAKAGAWA, S.; NIWA, M. [Blood-Brain Barrier (BBB)]. *Nihon Yakurigaku Zasshi*, v. 133, n. 3, p. 170-2, 2009.

NAU, R.; SORGEL, F.; EIFFERT, H. Penetration of drugs through the blood-cerebrospinal fluid/blood-brain barrier for treatment of central nervous system infections. *Clin Microbiol Rev*, v. 23, n. 4, p. 858-83, 2010.

NAZ, F.; SIDDIQUE, Y. H. "Nanotecnologia: Sua aplicação no tratamento de doenças neurodegenerativas." *CNS e distúrbios neurológicos-alvos de drogas (anteriormente atuais alvos de drogas-SNC e distúrbios neurológicos)* 20, no. 1: 34-53, 2021.

NEGRINI, M.; FIDELIS, E. G.; SCHURT, D. A.; SILVA, F. S.; PEREIRA, R.S.; BIZZO, H. R. Atividade inseticida de óleos essenciais no controle da lagarta-do-outono, *Spodoptera frugiperda*. *Arquivos do Instituto Biológico*, 86, e1112018, 2019.

NOORI KOOPAEI, M.; KHOSHAYAND, M. R.; MOSTAFAVI, S. H.; AMINI, M.; KHORRAMIZADEH, M. R.; JEDDI TEHRANI, M.; ATYABI, F.; DINARVAND, R. Docetaxel Loaded PEG-PLGA Nanoparticles: Optimized Drug Loading, In-vitro Cytotoxicity and In-vivo Antitumor Effect. *Iran J Pharm Res*, v. 13, n. 3, p. 819-33, 2014.

NOVAES, L.; FERNANDO, T. Síntese total de terpenos e meroterpenos: actinoranona, pleocarpanona e sesquiterpenos "Illicium". 1 recurso online (372 p.). Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química, Campinas, SP, 2019.

OH K.H.; KIM H. Ensaio de paralisia induzida por Aldicarb para determinar defeitos na transmissão sináptica em *Caenorhabditis elegans*. *Bioprotocol*. 20 de julho de 2017; 7(14).

ON, N. H.; MITCHELL, R.; SAVANT, S. D.; BACHMEIER, C. J.; HATCH, G. M.; MILLER, D. W. Examination of blood-brain barrier (BBB) integrity in a mouse brain tumor model. *J Neurooncol*, v. 111, n. 2, p. 133-43, 2013.

ÖZDEMİR, Z.; ÖZÇELİK, A. B.; UYSAL, M. Approaches Based on Cholinergic Hypothesis and Cholinesterase Inhibitors in the Treatment of Alzheimer's Disease. *Frontiers in Clinical Drug Research-Alzheimer Disorders*, 8, 154, 2019.

DI PAOLO, M.; PAPI, L.; GORI, F.; TURILLAZZI, E. Natural products in neurodegenerative diseases: A great promise but an ethical challenge. *International Journal of Molecular Sciences*. 2019 Jan;20(20):5170, 2019.

PATTON, S. M.; WANG, Q.; HULGAN, T.; CONNOR, J. R.; JIA, P.; ZHAO, Z.; LETENDRE, S. L.; ELLIS, R. J.; BUSH, W. S.; SAMUELS, D. C.; FRANKLIN, D. R.; KAUR, H.; IUDICELLO, J.; GRANT, I.; KALLIANPUR, A. R. Cerebrospinal fluid (CSF) biomarkers of iron status are associated with CSF viral load, antiretroviral therapy, and demographic factors in HIV-infected adults. *Fluids Barriers CNS*, v. 14, n. 1, p. 11, 2017.

PEISKER, T.; KOZNAR, B.; STETKAROVA, I.; WIDIMSKY, P. Acute stroke therapy: A review. *Trends Cardiovasc Med*, v. 27, n. 1, p. 59-66, 2017.

PEREIRA, A.R.A.; VELHO, A.P.M.; CORTEZ, D.A.G.; SZERWIESKI, L.L.D.; CORTEZ, L.E. R. Traditional use of medicinal plants by elderly. *Revista da Rede de Enfermagem do Nordeste*, vol. 17, núm. 3, mayo-junio, pp. 427, 2016.

PIAO, X.; SUN, M.; YI, F. Evaluation of nematocidal action against *Caenorhabditis elegans* of essential oil of flesh fingered citron and its mechanism. *Journal of Chemistry*. 2020 Mar 19;2020.

PIYOOSH SHARMA, PAVAN SRIVASTAVA, ANKIT SETH, PRABHASH NATH TRIPATHI, ANUPAM G. BANERJEE, SUSHANT K. SHRIVASTAVA. Comprehensive review of mechanisms of pathogenesis involved in Alzheimer's disease and potential therapeutic strategies. *Progress in Neurobiology* 174, 53–89, 2019.

PORTELLA, A. C. F.; MUNARO, M.; ASCÊNCIO, S. D.; SIQUEIRA, C. A.; FERREIRA, T. P. S.; AGUIAR, R. W. S. Caracterização físico-química do óleo essencial da *Siparuna guianensis* Aublet. *Química Nova*, 37(5), 844-849, 2014.

PORTO, M.; VALADARES, Y.; SILVA, C.; SANTOS, R.; GUALBERTO, S. "AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Thymus vulgaris* L. (Lamiaceae)." *ENCICLOPÉDIA BIOSFERA* 18, nº. 38, 2021.

PRABHAKARPANDIAN, B.; SHEN, M. C.; NICHOLS, J. B.; MILLS, I. R.; SIDORYK-WEGRZYNOWICZ, M.; ASCHNER, M.; PANT, K. SyM-BBB: a microfluidic Blood Brain Barrier model. *Lab Chip*, v. 13, n. 6, p. 1093-101, 2013.

PRESA, F.B.; MARQUES, M.L.M.; VIANA, R.L.S.; NOBRE, L.T.D.B.; COSTA, L.S.; ROCHA, H.A.O. The Protective role of sulfated polysaccharides from green seaweed *Udotea flabellum* in cells exposed to oxidative damage. *Mar. Drugs*. 16, 1–16, 2018.

PULLAGURI N.; KAGOO A.R.; BHARGAVA A. Novos insights sobre a natureza inibitória do triclosan na atividade da acetilcolinesterase. *Toxicologia*. 30 de janeiro de 2022; 466:153080, 2022.

QOSA, H.; MILLER, D. S.; PASINELLI, P.; TROTTI, D. Regulation of ABC efflux transporters at blood-brain barrier in health and neurological disorders. *Brain Res*, v. 1628, n. Pt B, p. 298-316, 2015.

RAFIEI, P.; HADDADI, A. Docetaxel-loaded PLGA and PLGA-PEG nanoparticles for intravenous application: pharmacokinetics and biodistribution profile. *Int J Nanomedicine*, v. 12, p. 935-947, 2017.

RAVINDRAN, J.; NAIR, H. B.; SUNG, B.; PRASAD, S.; TEKMAL, R. R.; AGGARWAL, B. B. Thymoquinone poly (lactide-co-glycolide) nanoparticles exhibit enhanced anti-proliferative, anti-inflammatory, and chemosensitization potential. *Biochem Pharmacol*, v. 79, n. 11, p. 1640-7, 2010.

REFAI O.; BLAKELY, R.D. Bloqueio e reversão da paralisia induzida pela natação em *C. elegans* pelo antipsicótico e antagonista do receptor de dopamina tipo D2 azaperona. *Neuroquímica Internacional*. 1º de fevereiro de 2019; 123:59-68, 2019.

REHMAN, M.U.; WALI AF, AHMAD A, SHAKEEL S, RASOOL S, ALI R, RASHID SM, MADKHALI H, GANAIE MA, KHAN R. Neuroprotective strategies for neurological disorders by natural products: an update. *Current neuropharmacology*. Mar 1;17(3):247-67, 2019.

REITZ, C. Genomic insights into the etiology of Alzheimer's disease: a review. *Advances in genomics & genetics*, 4, 59-66, 2014.

RICE N.C.; RAUSCHER N.A.; MOFFETT M.C.; MYERS T.M. Avaliação organoléptica e determinação da dose letal mediana de aldicarb oral em ratos. *Anais da Academia de Ciências de Nova York*. 2020 novembro;1480(1):136-45, 2020.

RICCIARELLI, R., & FEDELE, E. The amyloid cascade hypothesis in Alzheimer's disease: it's time to change our mind. *Current neuropharmacology*, 15(6), 926-935, 2017.

ROCHA, C.M.; FIGUEIREDO, F.F. "Saberes tradicionais, biodiversidade, práticas integrativas e complementares: o uso de plantas medicinais no SUS." *Hygeia: Revista Brasileira de Geografia Médica e da Saúde* 15.31: 56, 2019.

RODA, E.; NION, S.; BERNOCCHI, G.; COCCINI, T. Blood-brain barrier (BBB) toxicity and permeability assessment after L-(4-(1)(0)Boronophenyl)alanine, a conventional B-containing drug for boron neutron capture therapy, using an in vitro BBB model. *Brain Res*, v. 1583, p. 34-44, 2014.

ROMANO, J. G.; SACCO, R. L. Decade in review-stroke: progress in acute ischaemic stroke treatment and prevention. *Nat Rev Neurol*, v. 11, n. 11, p. 619-21, 2015.

ROMERMANN, K.; FEDROWITZ, M.; HAMPEL, P.; KACZMAREK, E.; TOLLNER, K.; ERKER, T.; SWEET, D. H.; LOSCHER, W. Multiple blood-brain barrier transport mechanisms limit bumetanide accumulation, and therapeutic potential, in the mammalian brain. *Neuropharmacology*, v. 117, p. 182-194, 2017.

SALESSE, D.; MEDEIROS, F. C.; SILVA, C. C. M.; LOURENÇO, E. L. B.; JACOMASSI, E. Etnobotânica e Etnofarmacologia das espécies de Amoryllidaceae, Anacardiaceae, Annonaceae e Apiaceae. *Arq. Cienc. Saúde UNIPAR, Umuarama*, v. 22, n. 3, p. 199-204, set./dez. 2018.

SAJADIMAJD, S.; MORADI, S.Z.; AKBARI, V.; AGHAZ, F.; FARZAEI, M.H. Nanoformulated herbal bioactives for the treatment of neurodegenerative disorders. In *Herbal Bioactive-Based Drug Delivery Systems 2022 Jan 1* (pp. 371-391). Academic Press, 2022.

SAMOKHVALOV, A. Analysis of various solid samples by synchronous fluorescence spectroscopy and related methods: A review. *Talanta*, 120944, 2020.

SANT'ANA, N. J., GARCIA FILHO, P. H., MENDONÇA, R. R., & KAMADA, M. Terapia anti-amiloide: uma nova estratégia para tratamento da doença de Alzheimer. *Revista da Sociedade Brasileira de Clínica Médica*, 16(2), 127-131, 2018.

SANTOS, A. S.; ALVES, S. D. M.; FIGUEIREDO, F. J. C.; DA ROCHA NETO, O. G. Descrição de sistema e de métodos de extração de óleos essenciais e determinação de umidade de biomassa em laboratório. *Embrapa Amazônia Oriental-Comunicado Técnico (INFOTECA-E)*, 2004.

SANTOS, D. L.; MORAES, J. S.; ARAÚJO, Z. T. DE S.; DA SILVA, I. R. Saberes tradicionais sobre plantas medicinais na conservação da biodiversidade amazônica. *Ciências Em Foco*, 12(1), 2019.

SANTOS, D. L.; MORAES, J. S.; DE SOUZA ARAÚJO, Z. T.; DA SILVA, I. R. Saberes tradicionais sobre plantas medicinais na conservação da biodiversidade amazônica. *Ciências em Foco*, 12(1), 2019.

SANTOS, T. C. D.; RESCIGNANO, N.; BOFF, L.; REGINATTO, F. H.; SIMOES, C. M. O.; DE CAMPOS, A. M.; MIJANGOS, C. U. Manufacture and characterization of chitosan/PLGA nanoparticles nanocomposite buccal films. *Carbohydr Polym*, v. 173, p. 638-644, 2017.

SARAF, S. Process optimization for the production of nanoparticles for drug delivery applications. *Expert Opin Drug Deliv*, v. 6, n. 2, p. 187-96, 2009.

SATHYA, S.; SHANMUGANATHAN, B.; SARANYA, S.; VAIDEVI, S.; RUCKMANI, K.; PANDIMA, D. K. Phytol-loaded PLGA nanoparticle as a modulator of Alzheimer's toxic A $\beta$  peptide aggregation and fibrillation associated with impaired neuronal cell function. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*. Nov 17;46(8):1719-30, 2018.

SATHYA, S.; SHANMUGANATHAN, B.; BALASUBRAMANIAM, B.; BALAMURUGAN, K.; DEVI, K.P. Phytol loaded PLGA nanoparticles regulate the expression of Alzheimer's related

genes and neuronal apoptosis against amyloid- $\beta$  induced toxicity in Neuro-2a cells and transgenic *Caenorhabditis elegans*. *Food and Chemical Toxicology*. 2020 Feb 1; 136:110962, 2020.

SAVALIYA, R.; SHAH, D.; SINGH, R.; KUMAR, A.; SHANKER, R.; DHAWAN, A.; SINGH, S. Nanotechnology in Disease Diagnostic Techniques. *Curr Drug Metab*, v. 16, n. 8, p. 645-61, 2015.

SBALQUEIRO, G.; BALVEDI, L.; BETTIATO, R.; RIBAS, J. Uso da nanotecnologia para o desenvolvimento de fármacos. *Revista Saúde e Desenvolvimento*, 12(10), 242-252, 2018.

SEDMAK, J.J.; GROSSBERG, S.E. A rapid, sensitive and versatile assay for protein using coomassie brilliant blue G250. *Anal. Biochem*. 79, 544–552, 1977.

SCHAFFAZICK, S. R., GUTERRES, S. S., FREITAS, L. D. L., & POHLMANN, A. R. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. *Química nova*, 26(5), 726-737, 2003.

SCHAFFAZICK, S. R.; POHLMANN, A. R.; DALLA-COSTA, T.; GUTERRES, S. S. Freeze-drying polymeric colloidal suspensions: nanocapsules, nanospheres and nanodispersion. A comparative study. *Eur J Pharm Biopharm*, v. 56, n. 3, p. 501-5, 2003.

SCHAFFAZICK, S. R.; POHLMANN, A. R.; DE CORDOVA, C. A.; CRECZYNSKI-PASA, T. B.; GUTERRES, S. S. Protective properties of melatonin-loaded nanoparticles against lipid peroxidation. *Int J Pharm*, v. 289, n. 1-2, p. 209-13, 2005.

SCHULTENS, F.; STROOPER, B.; KIVIPELTO, M.; HOLSTEGE, H.; CHÉTELAT, G.; TEUNISSEN, C.E.; CUMMINGS, J.; VAN DER FLIER, W.M. Alzheimer's disease, *The Lancet*, Volume 397, Issue 10284, 2021.

SCHMIDT, D. L. Nanotechnology and Education. In: *Women in Nanotechnology*. Springer, Cham, p. 29-41, 2020.

SEDMAK, J.J., GROSSBERG, S.E., A rapid, sensitive and versatile assay for protein using coomassie brilliant blue G250. *Anal. Biochem*. 79, 544–552, 1977.

SHAD, A. A.; BAKHT, J.; SHAH, H. U.; HAYAT, Y. Antioxidant activity and nutritional assessment of under-utilized medicinal plants. *Pak J Pharm Sci*, v. 29, n. 6, p. 2039-2045, 2016.

SHAH, L.; YADAV, S.; AMIJI, M. Nanotechnology for CNS delivery of bio-therapeutic agents. *Drug Deliv Transl Res*, v. 3, n. 4, p. 336-51, 2013.

SHAL, B.; DING, W.; ALI, H.; KIM, Y.S.; KHAN, S. Anti-neuroinflammatory Potential of Natural Products in Attenuation of Alzheimer's Disease. *Front. Pharmacol*. 9:548, 2018.

SHARMA, D.; SHARMA, R. K.; BHATNAGAR, A.; NISHAD, D. K.; SINGH, T.; GABRANI, R.; SHARMA, S. K.; ALI, J.; DANG, S. Nose to Brain Delivery of Midazolam Loaded PLGA Nanoparticles: In Vitro and In Vivo Investigations. *Curr Drug Deliv*, v. 13, n. 4, p. 557-64, 2016.

SHARMA, G.; SHARMA, A. R.; LEE, S. S.; BHATTACHARYA, M.; NAM, J. S.; CHAKRABORTY, C. Advances in nanocarriers enabled brain targeted drug delivery across blood brain barrier. *International Journal of Pharmaceutics*, 559, 360-372, 2019.

SHARMA, P., SRIVASTAVA, P., SETH, A., TRIPATHI, P. N., BANERJEE, A. G., & SHRIVASTAVA, S. K. Comprehensive review of mechanisms of pathogenesis involved in Alzheimer's disease and potential therapeutic strategies. *Progress in neurobiology*, 174, 53-89, 2019.

SHEN, P.; YUE, Y.; ZHENG, J.; PARK, Y. Caenorhabditis elegans: a convenient in vivo model for assessing the impact of food bioactive compounds on obesity, aging, and Alzheimer's disease. *Annual review of food science and technology*. Mar 25; 9:1-22, 2018.

SHROCK, E.; GÜELL, M. CRISPR in Animals and Animal Models. *Prog Mol Biol Transl Sci*. 152:95-114, 2017.

SINGH, A.; KUKRETI, R.; SASO, L.; KUKRETI, S. Estresse Oxidativo: Um Modulador Chave em Doenças Neurodegenerativas. *Moléculas*. 22 de abril de 2019; 24(8):1583, 2019.

SILVA ADAYA, D.; AGUIRRE-CRUZ, L.; GUEVARA, J.; ORTIZ-ISLAS, E. Nanobiomaterials' applications in neurodegenerative diseases. *J Biomater Appl*, v. 31, n. 7, p. 953-984, 2017.

SILVA, E. A. P.; CARVALHO, J. S.; GUIMARÃES, A. G.; BARRETO, R. S.S.; SANTOS, M. R.V.; BARRETO, A. S.; QUINTANS-JÚNIOR, L. J. The use of terpenes and derivatives as a new perspective for cardiovascular disease treatment: a patent review (2008–2018), *Expert Opinion on Therapeutic Patents*. 2018.

SILVA, N. C. S.; ARAÚJO, G. C.; OLIVEIRA, T. G.; BICALHO, T. C. F. Nanotecnologia Aplicada aos Cosméticos. *ÚNICA Cadernos Acadêmicos*, 2(1), 2019.

SIVAKUMAR, B.; ASWATHY, R. G.; ROMERO-ABURTO, R.; MITCHAM, T.; MITCHEL, K. A.; NAGAOKA, Y.; BOUCHARD, R. R.; AJAYAN, P. M.; MAEKAWA, T.; SAKTHIKUMAR, D. N. Highly versatile SPION encapsulated PLGA nanoparticles as photothermal ablaters of cancer cells and as multimodal imaging agents. *Biomater Sci*, v. 5, n. 3, p. 432-443, 2017.

SOARES, I. M.; DA COSTA, O. J.; AGUIAR, A. A.; BARBOSA, R. S.; ALVIM, T. C.; AGUIAR, R. W. S. "Aplicação de um processo de desengorduramento e extração sequencial assistida por ultra-som para obter compostos fenólicos e elucidar o potencial antioxidante de *Siparuna guianensis* Aublet." *Journal of Medicinal Plants Research* 11, não. 21 2017: 357-366, 2017.

SONI, V.; KOHLI, D. V.; JAIN, S. K. Transferrin coupled liposomes as drug delivery carriers for brain targeting of 5-florouracil. *J Drug Target*, v. 13, n. 4, p. 245-50, 2005.

SORIANO, M. L.; ZOUGAGH, M.; VALCARCEL, M.; RIOS, A. Analytical Nanoscience and Nanotechnology: Where we are and where we are heading. *Talanta*, 177, 104-121, 2018.

SOTO, C.; PRITZKOW, S. Protein misfolding, aggregation, and conformational strains in neurodegenerative diseases. *Nature neuroscience*, v. 21, n. 10, p. 1332-1340, 2018.

SOUSA, I. J. O., DE ARAÚJO, S. I. M. O. N. E., NEGREIROS, P. D. S., FRANÇA, A. R. D. S., ROSA, G. D. S., NEGREIROS, F. D. S., & GONÇALVES, R. L. G. A diversidade da flora brasileira no desenvolvimento de recursos de saúde. *REVISTA UNINGÁ REVIEW*, 31(1) 2017.

SOUZA, E. S. D., SANTOS, A. M. D. S., & SILVA, A. D. J. D. Doença de Alzheimer: abordagem sobre a Fisiopatologia, 2021.

SOUTO, E. B.; SEVERINO, P.; SANTANA, M. H. A. Preparação de nanopartículas poliméricas a partir de polímeros pré-formados: parte II. *Polímeros*, v. 22, n. 1, p. 101-106, 2012.

SOUTO, ELIANA B.; SEVERINO, PATRÍCIA; SANTANA, MARIA HELENA A. Preparação de nanopartículas poliméricas a partir da polimerização de monômeros: parte I. *Polímeros*, v. 22, n. 1, p. 96-100, 2012.

SOUZA, C. M. P., BRANDÃO, D. O., SILVA, M. S. P., PALMEIRA, A. C., SIMÕES, M. O. S., & MEDEIROS, A. C. D. Utilização de plantas medicinais com atividade antimicrobiana por usuários do serviço público de saúde em Campina Grande-Paraíba. *Revista Brasileira de Plantas Medicinai*s, 15(2), 188-193, 2013.

SOUZA, P.R. SOUZA, K. S.; ASSIS, C. R. D.; ARAÚJO, M.C.; SILVA, K.C.C.; SILVA, J.F.X.; FERREIRA, A.C.M.; SILVA, V.L.; ADAMF, M.L.; CARVALHO, L.B.C. BEZERRA, R.S. Acetylcholinesterase of mangrove oyster *Crassostrea rhizophorae*: A highly thermostable enzyme with promising features for estuarine biomonitoring. *Aquatic Toxicology* 197 (2018) 109–121, 2018.

SPUCH, C., SAIDA, O. & NAVARRO, C. Avanços no tratamento de distúrbios neurodegenerativos empregando nanopartículas. *Patentes recentes sobre administração e formulação de medicamentos*, 6 (1), 2-18, 2012.

SPUCH, C.; SAIDA, O.; NAVARRO, C. Advances in the treatment of neurodegenerative disorders employing nanoparticles. *Recent Pat Drug Deliv Formul*, v. 6, n. 1, p. 2-18, 2012.

SRIKANTH, M.; KESSLER, J. A. Nanotechnology-novel therapeutics for CNS disorders. *Nat Rev Neurol*, v. 8, n. 6, p. 307-18, 2012.

STANCIU, G.D.; LUCA, A., RUSU, RN, BILD, V., BESCHEA CHIRIAC, SI, SOLCAN, C., ... E ABABEI, DC. Farmacoterapia da doença de Alzheimer em relação ao envolvimento do sistema colinérgico. *Biomoléculas*, 10 (1), 40, 2020.

STEICHEN, S. D.; CALDORERA-MOORE, M.; PEPPAS, N. A. A review of current nanoparticle and targeting moieties for the delivery of cancer therapeutics. *Eur J Pharm Sci*, v. 48, n. 3, p. 416-27, 2013.

STEPHENSON, J.; NUTMA, E.; VAN DER VALK, P., & AMOR, S. Inflammation in CNS neurodegenerative diseases. *Immunology*, 154(2), 204-219 2018.

SUN, D.; LI, N.; ZHANG, W.; ZHAO, Z.; MOU, Z.; HUANG, D.; LIU, J.; WANG, W. Design of PLGA-functionalized quercetin nanoparticles for potential use in Alzheimer's disease. *Colloids Surf B Biointerfaces*, v. 148, p. 116-129, 2016.

SUN, X.; DUAN, Y. R.; HE, Q.; LU, J.; ZHANG, Z. R. PELGE nanoparticles as new carriers for the delivery of plasmid DNA. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, v. 53, n. 6, p. 599-603, 2005.

TADINI, A. M.; MOUNIER, S.; MILORI, D. M. B. P. Modeling the quenching of fluorescence from organic matter in Amazonian soils. *Science of The Total Environment*, v. 698, p. 134067, 2020.

TAKAHASHI-ITO, K., MAKINO, M., OKADO, K., & TOMITA, T. Memantine inhibits  $\beta$ -amyloid aggregation and disassembles preformed  $\beta$ -amyloid aggregates. *Biochemical and biophysical research communications*, 493(1), 158-163, 2017.

TAKANO, K.; KOARASHI, K.; KAWABE, K.; ITAKURA, M.; NAKAJIMA, H.; MORIYAMA, M.; NAKAMURA, Y. Expressão da insulina em astrócitos cultivados e diminuição do  $\beta$  amilóide. *Neurochemistry international*, 119, 171-177, 2018.

TAKESHITA, Y.; KANDA, T. [The Blood-Brain Barrier (BBB) and in vitro BBB Models]. *Brain Nerve*, v. 67, n. 8, p. 1035-42, 2015.

TEIXEIRA, A.; BAENAS, N.; DOMINGUEZ-PERLES, R.; BARROS, A.; ROSA, E.; MORENO, D. A.; GARCIA-VIGUERA, C. Natural bioactive compounds from winery by-products as health promoters: a review. *Int J Mol Sci*, v. 15, n. 9, p. 15638-78, 2014.

TESTA, P. A.; DE ROSA, K. Rodrigues; FAVERO, Leandro. BIODIVERSIDADE: PRINCIPAIS AMEAÇAS E ALERTAS. *RETEC-Revista de Tecnologias*, v. 13, n. 1, 2020.

TEUNISSEN, C. E.; WILLEMSE, E. Cerebrospinal Fluid Biomarkers for Alzheimer's Disease: Emergence of the Solution to an Important Unmet Need. *EJIFCC*, v. 24, n. 3, p. 97-104, 2013.

TOBLER, J. P.; ROCHA, H. V. A. Bases regulatórias para a avaliação da segurança de medicamentos à base de nanotecnologia. *Vigilância Sanitária em Debate: Sociedade, Ciência & Tecnologia*, v. 8, n. 2, p. 64-74, 2020.

TIWARI, S.; ATLURI, V.; KAUSHIK, A.; YNDART, A.; NAIR, M. Alzheimer's disease: pathogenesis, diagnostics, and therapeutics. *International journal of nanomedicine*, 14, 5541-5554, 2019.

TÖNNIES, E.; TRUSHINA, E. Oxidative Stress, Synaptic Dysfunction, and Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's disease: JAD*, 57(4), 1105-1121, 2017.

TONK, M.; HAAN, J. A review of genetic causes of ischemic and hemorrhagic stroke. *J Neurol Sci*, v. 257, n. 1-2, p. 273-9, 2007.

UCHIDA, Y.; OHTSUKI, S.; KAMIIE, J.; TERASAKI, T. Blood-brain barrier (BBB) pharmacoproteomics: reconstruction of in vivo brain distribution of 11 P-glycoprotein substrates based on the BBB transporter protein concentration, in vitro intrinsic transport activity, and unbound fraction in plasma and brain in mice. *J Pharmacol Exp Ther*, v. 339, n. 2, p. 579-88, 2011.

VALENTINI, C. M. A.; SILVA, L. E.; MACIEL, E. N.; FRANCESCHINI, E.; SOUSA Jr. P. T.; DALL'OGGIO, E. L. Annual variation of the yield and chemical composition of the volatile components of *Siparuna guianensis* Aublet. *New Chemistry*, v. 33, p. 1506-150, 2010.

VAN DE VEL, E., SAMPERS, I., & RAES, K.). Uma revisão sobre fatores influentes na concentração inibitória mínima de óleos essenciais. *Revisões críticas em ciência e nutrição de alimentos*, 59 (3), 357-378, 2019.

VAN PELT, K. M.; TRUTTMANN, M.C. "Caenorhabditis elegans como um sistema modelo para estudar doenças neurodegenerativas associadas ao envelhecimento." *Medicina translacional do envelhecimento* 4: 60-72., 2020.

VARMA, R.K.; VERMA, S.; CHAUDHARY, R. Revisão perspectiva do apatamento de peptídes beta (ab) amilóides na doença de Alzheimer: foco em transportadores abc. *Jornal indiano de drogas*, 7 (1), 20-29, 2019.

VEDAGIRI, A.; THANGARAJAN, S. Mitigating effect of chrysin loaded solid lipid nanoparticles against Amyloid beta<sub>25-35</sub> induced oxidative stress in rat hippocampal region: An efficient formulation approach for Alzheimer's disease. *Neuropeptides*, v. 58, p. 111-25, 2016.

VORBRODT, A. W.; LOSSINSKY, A. S.; DOBROGOWSKA, D. H.; WISNIEWSKI, H. M. Cellular mechanisms of the blood-brain barrier (BBB) opening to albumin-gold complex. *Histol Histopathol*, v. 8, n. 1, p. 51-61, 1993.

WACKERLIG, J.; SCHIRHAGL, R. Applications of Molecularly Imprinted Polymer Nanoparticles and Their Advances toward Industrial Use: A Review. *Anal Chem*, v. 88, n. 1, p. 250-61, 2016.

WAISKOPF, N.; SOREQ, H. Cholinesterase Inhibitors: From Molecular Mechanisms of Action to Current and Future Prospects. In *Handbook of Toxicology of Chemical Warfare Agents* (pp. 761-778). Academic Press, 2015.

WANG, J. T.; LIN, D. H.; QIN, L. F.; WEN, Z.; GUO, G. P. [Transport of mPEG-PLGA nanoparticles across the rat nasal mucosa]. *Yao Xue Xue Bao*, v. 48, n. 5, p. 752-8, 2013.

WANG, L.; LI, H.; YANG, Y.; ZHANG, D.; WU, M.; PAN, B.; XING, B. Identifying structural characteristics of humic acid to static and dynamic fluorescence quenching of phenanthrene, 9-phenanthrol, and naphthalene. *Water research*, 122, 337-344, 2017.

WANG, N.; WANG, E.; WANG, R.; MUHAMMAD, F.; LI, T.; YUE, J.; ZHOU, Y.; ZHI, D.; LI, H. O ácido ursólico melhora os sintomas patológicos induzidos por  $\beta$  amilóide em *Caenorhabditis elegans* ativando o proteossoma. *Neurotoxicologia*. 1 de janeiro de 2022; 88:231-40, 2022.

- WANG, T.; ZENG, L. H.; LI, D. LA review on the methods for correcting the fluorescence inner-filter effect of fluorescence spectrum. *Applied Spectroscopy Reviews*, 52(10), 883-908, 2017.
- WANG, X.; LI, G. J.; ZHENG, W. Efflux of iron from the cerebrospinal fluid to the blood at the blood-CSF barrier: effect of manganese exposure. *Exp Biol Med (Maywood)*, v. 233, n. 12, p. 1561-71, 2008.
- WANG, Y.; JIN, Y.; ZHOU, C.; QU, H.; CHENG, Y. Discovering active compounds from mixture of natural products by data mining approach. *Med Biol Eng Comput*, v. 46, n. 6, p. 605-11, 2008.
- WANG, Z.; HE, C.; SHI, J. S. Natural products for the treatment of neurodegenerative diseases. *Current medicinal chemistry*, 2020.
- WEN, M. M.; EL-SALAMOUNI, N. S.; EL-REFAIE, W. M.; HAZZAH, H. A.; ALI, M. M.; TOSI, G.; FARID, R. M.; BLANCO-PRIETO, M. J.; BILLA, N.; HANAFY, A. S. Nanotechnology-based drug delivery systems for Alzheimer's disease management: Technical, industrial, and clinical challenges. *J Control Release*, v. 245, p. 95-107, 2017.
- WEN, X.; DING, S.; CAI, H.; WANG, J.; WEN, L.; YANG, F.; CHEN, G. Nanomedicine strategy for optimizing delivery to outer hair cells by surface-modified poly(lactic/glycolic acid) nanoparticles with hydrophilic molecules. *Int J Nanomedicine*, v. 11, p. 5959-5969, 2016.
- WILSON, B.; SAMANTA, M. K.; SANTHI, K.; KUMAR, K. P.; PARAMAKRISHNAN, N.; SURESH, B. Poly(n-butylcyanoacrylate) nanoparticles coated with polysorbate 80 for the targeted delivery of rivastigmine into the brain to treat Alzheimer's disease. *Brain Res*, v. 1200, p. 159-68, 2008.
- WIN-SHWE, T. T.; FUJIMAKI, H. Nanoparticles and neurotoxicity. *Int J Mol Sci*, v. 12, n. 9, p. 6267-80, 2011.
- WOHLFART, Stefanie; GELPERINA, Svetlana; KREUTER, Jörg. Transport of drugs across the blood-brain barrier by nanoparticles. *Journal of controlled release*, v. 161, n. 2, p. 264-273, 2012.
- WOOD W.B. Determination of pattern and fate in early embryos of *Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol (N Y 1985)*. 1988; 5:57-78, 1988.
- WORRALL, E. A.; Hamid, A.; Mody, K.T.; Mitter, N.; Pappu, H.R. "Nanotecnologia para manejo de doenças de plantas." *Agronomia* 8, n. 12: 285, 2018.
- WUBETU, M.; ABULA, T.; DEJENU, G. Ethnopharmacologic survey of medicinal plants used to treat human diseases by traditional medical practitioners in Dega Damot district, Amhara, Northwestern Ethiopia. *BMC Res Notes*, v. 10, n. 1, p. 157, 2017.
- XIE, J.; DONG, H.; YU, Y.; CAO, S. Inhibitory effect of synthetic aromatic heterocycle thiosemicarbazone derivatives on mushroom tyrosinase: Insights from fluorescence, <sup>1</sup>H NMR titration and molecular docking studies. *Food Chemistry* 190 709–716, 2016.

XU, J., LIU, J., ZHU, X., YU, Y.; CAO, S. Novel inhibitors of tyrosinase produced by the 4-substitution of TCT. *Food chemistry*, 221, 1530-1538, 2017.

YADAV, D.; SRIVASTAVA, S.; TRIPATHI, Y.B. *Acorus Calamus*: a review Revisão. *Int. J. Sci. Res. em Biological Sciences Vol. 6*, 4, 2019.

YANG, J.; ASCHNER, M. Developmental aspects of blood-brain barrier (BBB) and rat brain endothelial (RBE4) cells as in vitro model for studies on chlorpyrifos transport. *Neurotoxicology*, v. 24, n. 4-5, p. 741-5, 2003.

YOUNG, S. C. A systematic review of antiamyloidogenic and metal-chelating peptoids: two structural motifs for the treatment of Alzheimer's disease. *Molecules*, 23(2), 296, 2018.

YU, M.; WU, J.; SHI, J.; FAROKHZAD, O. C. Nanotechnology for protein delivery: Overview and perspectives. *J Control Release*, v. 240, p. 24-37, 2016.

YUE, J.; LIU, S.; WANG, R.; HU, X.; XIE, Z.; HUANG, Y.; JING, X. Fluorescence-labeled immunomicelles: preparation, in vivo biodistribution, and ability to cross the blood-brain barrier. *Macromol Biosci*, v. 12, n. 9, p. 1209-19, 2012.

ZAGO, L. D. M. S.; DE MOURA, M. E. P. Vinte e dois anos de pesquisa sobre plantas medicinais: uma análise cienciométrica. *Tecnia*, 3(1), 157-173, 2018.

ZHANG, B.; LIN, L.; WU, S. A Review of Brain Atrophy Subtypes Definition and Analysis for Alzheimer's Disease Heterogeneity Studies. *J Alzheimers Dis.* 80(4):1339-1352, 2021.

ZHANG, F.; XU, C. L.; LIU, C. M. Drug delivery strategies to enhance the permeability of the blood-brain barrier for treatment of glioma. *Drug Des Devel Ther*, v. 9, p. 2089-100, 2015.

ZHANG, H.; ZHANG, Y.; SHI, Q.; HU, J.; CHU, M.; YU, J.; YANG, M. Study on transformation of natural organic matter in source water during chlorination and its chlorinated products using ultrahigh resolution mass spectrometry. *Environ Sci Technol*, v. 46, n. 8, p. 4396-402, 2012.

ZHANG, K.; ROTHSTEIN, J. D. Neurodegenerative disease: Two-for-one on potential therapies. *Nature*, v. 544, n. 7650, p. 302-303, 2017.

ZHANG, L.; GU, B.; WANG, Y. "O óleo essencial de cravo confere atividade antioxidante e extensão da vida útil em *C. elegans* através do fator de transcrição DAF-16/FOXO." *Bioquímica e Fisiologia Comparativa Parte C: Toxicologia e Farmacologia*. 242: 108938, 2021.

ZHANG, X. G., WANG, X., ZHOU, T. T., WU, X. F., PENG, Y., ZHANG, W. Q., LI, S., & ZHAO, J. (2016). Scorpion Venom Heat-Resistant Peptide Protects Transgenic *Caenorhabditis elegans* from  $\beta$ -Amyloid Toxicity. *Frontiers in pharmacology*, 7, 227, 2016.

ZHU S, LI H, DONG J, YANG W, LIU T, WANG Y, WANG X, WANG M, ZHI D. Rose Essential Oil Delayed Alzheimer's Disease-Like Symptoms by SKN-1 Pathway in *C. elegans*. *J Agric Food Chem.* Oct 11;65(40):8855-8865, 2017.

## 11. Anexos

## Artigos Publicados

1 - Impact on cholinesterase-inhibition and *in silico* investigations of sesquiterpenoids from Amazonian *Siparuna guianensis* Aubl.

Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy 252 (2021) 119511



Contents lists available at ScienceDirect

**Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/saa](http://www.elsevier.com/locate/saa)



---

## Impact on cholinesterase-inhibition and *in silico* investigations of sesquiterpenoids from Amazonian *Siparuna guianensis* Aubl.

Regildo M.G. Martins<sup>a,b</sup>, Francisco H. Xavier-Júnior<sup>c</sup>, Marcela R. Barros<sup>d</sup>, Thaís M. Menezes<sup>d</sup>, Caio R.D. de Assis<sup>e,f</sup>, Ana Cristina G.R. de Melo<sup>g</sup>, Bruno O. Veras<sup>h</sup>, Vany P. Ferraz<sup>i</sup>, Antonio A.M. Filho<sup>g</sup>, Gilvan T. Yogui<sup>f</sup>, Ranilson S. Bezerra<sup>e</sup>, Gustavo M. Seabra<sup>d,j</sup>, Jorge L. Neves<sup>d</sup>, Wanderli P. Tadei<sup>b,\*</sup>

<sup>a</sup> Post-Graduate in Biotechnology Multi-Institutional Program, PPGBIOEC, Federal University of Amazonas, UFAM, Av. General Rodrigo Otávio, 3000, Coroado, Manaus, Amazonas, Brazil

<sup>b</sup> Laboratory of Malaria and Dengue, National Institute for Amazonian Research, Manaus, AM, Brazil

<sup>c</sup> Post-Graduate Program in Biotechnology, University Potiguar Laureate International Universities, Campus Salgado Filho, 59075-000 Namí, RN, Brazil

<sup>d</sup> Biological Chemistry Laboratory, Departamento de Química Fundamental, Universidade Federal de Pernambuco - UFPE, Recife, PE, Brazil

<sup>e</sup> Biotechnology Laboratory, Department of Biochemistry, Federal University of Pernambuco - UFPE, Recife, PE, Brazil

<sup>f</sup> Laboratory of Organic Compounds in Coastal and Marine Ecosystems - OrganoMAR, Oceanography Department, Federal University of Pernambuco, Recife, PE, Brazil

<sup>g</sup> Center for Research and Postgraduate in Science and Technology, Postgraduate Program in Biotechnology and Biodiversity of Amazon, Environmental Chemistry Laboratory, Federal University of Roraima - UFRR, Boa Vista, RR, Brazil

<sup>h</sup> Laboratory of Natural Products - LPN, Department of Biochemistry, Federal University of Pernambuco - UFPE, Recife, PE, Brazil

<sup>i</sup> Chromatography Laboratory, Department of Chemistry, Institute of Exact Sciences, UFMG, Belo Horizonte, MG, Brazil

<sup>j</sup> Department of Medicinal Chemistry and Center for Natural Products, Drug Discovery and Development (CNPD3), School of Pharmacy, University of Florida, Gainesville, FL, USA

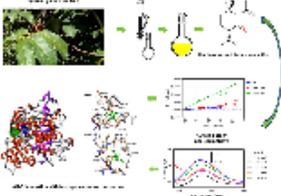


---

### HIGHLIGHTS

- Chemical characterization of the essential oil of Amazonian *Siparuna guianensis*.
- Shyobunone and derivatives were identified as major compounds in the oil.
- Iso-shyobunone is the strongest ligand according to molecular docking and <sup>1</sup>H NMR.
- Multi-spectroscopic methods confirmed shyobunone and derivatives as AChE inhibitors.
- Shyobunone and derivatives strongly interact with AChE in a non-competitive mechanism.

### GRAPHICAL ABSTRACT



---

### ARTICLE INFO

**Article history:**  
Received 12 August 2020  
Received in revised form 17 January 2021  
Accepted 18 January 2021  
Available online 29 January 2021

**Keywords:**  
*Siparuna guianensis* Aubl.  
Essential oil  
Shyobunone  
Acetylcholinesterase

\* Corresponding author.  
E-mail address: [wptadei@gmail.com](mailto:wptadei@gmail.com) (W.P. Tadei).

<https://doi.org/10.1016/j.saa.2021.119511>  
1386-1425/© 2021 Elsevier B.V. All rights reserved.

### ABSTRACT

The plant popularly known as "negramina" (*Siparuna guianensis* Aubl.), member of the family Siparunaceae produces an essential oil that presents several biological activities reported in literature. Here, the essential oil was obtained by hydrodistillation from fresh leaves collected in the state of Roraima, far north of the Amazon. Chemical composition of the essential oil was characterized by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS) and flame ionization detector (GC-FID). The sesquiterpenoid shyobunone and its derivatives were identified as major compounds in the oil (>40%). The effect of *S. guianensis* essential oil on the acetylcholinesterase (AChE) activity from *Crassostrea rhizophorae*, *Litopenaeus vannamei* and *Electrophorus electricus* was tested by spectrophotometric assays. The essential oil has been identified as an AChE inhibitor. The mechanism of inhibition was investigated as well as spectrofluorimetric interactions between the essential oil and the enzyme. <sup>1</sup>H NMR titration

## 2 – Effects of pyriproxyfen on zebrafish brain mitochondria and acetylcholinesterase

Chemosphere 263 (2021) 128029



Contents lists available at ScienceDirect

Chemosphere

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/chemosphere](http://www.elsevier.com/locate/chemosphere)

## Effects of pyriproxyfen on zebrafish brain mitochondria and acetylcholinesterase



Rafael D.S. Azevedo<sup>a</sup>, Kivia V.G. Falcão<sup>a</sup>, Caio R.D. Assis<sup>a,c</sup>, Regildo M.G. Martins<sup>b</sup>, Marlyete C. Araújo<sup>a</sup>, Gilvan T. Yogui<sup>c</sup>, Jorge L. Neves<sup>d</sup>, Gustavo M. Seabra<sup>e</sup>, Maria B.S. Maia<sup>f</sup>, Ian P.G. Amaral<sup>g</sup>, Ana C.R. Leite<sup>h</sup>, Ranilson S. Bezerra<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Laboratório de Enzimologia – LABENZ, Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brazil

<sup>b</sup> Universidade Federal do Amazonas (UFAM), Manaus, AM, Brazil

<sup>c</sup> Laboratório de Compostos Orgânicos em Ecossistemas Costeiros e Marinhos – OrganoMAR, Departamento de Oceanografia, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brazil

<sup>d</sup> Laboratório de Química Biológica – LOB, Departamento de Química Fundamental, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brazil

<sup>e</sup> Department of Medicinal Chemistry and Center for Natural Products, Drug Discovery and Development (CNPD3), School of Pharmacy, University of Florida, Gainesville, FL, USA

<sup>f</sup> Laboratório de Farmacologia de Produtos Bioativos, Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brazil

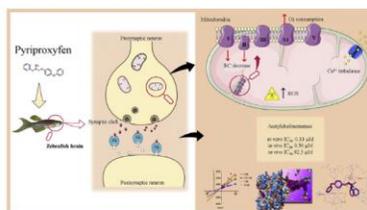
<sup>g</sup> Centro de Biotecnologia, Universidade Federal da Paraíba (UFPB), Campus I, Cidade Universitária, João Pessoa, PB, Brazil

<sup>h</sup> Laboratório de Bioenergética Prof. Anibal Vercesi, Departamento de Química e Biotecnologia, Universidade Federal de Alagoas (UFAL), Maceió, AL, Brazil

## HIGHLIGHTS

- A multilevel approach to pyriproxyfen neurotoxicity was performed.
- *In vitro* exposure of zbAChE to pyriproxyfen showed competitive-like inhibition.
- Brain O<sub>2</sub>S<sup>-</sup> production was dependent on the dose of pyriproxyfen;
- Calcium transport was changed after pyriproxyfen exposure.
- Pyriproxyfen showed that NOS activity is not a major route to cellular impairment.

## GRAPHICAL ABSTRACT



## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 15 June 2020

Received in revised form

12 August 2020

## ABSTRACT

Pyriproxyfen is an insecticide used worldwide that acts as a biomimetic of juvenile hormone. This study investigated metabolic and synaptic impairments triggered by pyriproxyfen using zebrafish acetylcholinesterase (zbAChE) and mitochondria as markers. A brain zbAChE assay was performed *in vitro* and *in vivo* covering a range of pyriproxyfen concentrations (0.001–10 μmol/L) to assess inhibition kinetics.

**Abbreviations:** AA, antimycin A; AAA, aryl acylamidase amino-sensitive; AChE, acetylcholinesterase; ADP, adenosine diphosphate; ATP, adenosine triphosphate; CAT, catalase; CCCP, carbonylcyanide 3-chlorophenylhydrazone; CNS, central nervous system; DAF-FM-DA, diamino fluorescein-FM diacetate; DCF, dichlorofluorescein; DTNB, 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid); eeAChE, *Electrophorus electricus* acetylcholinesterase; ER, endoplasmic reticulum; GPx, glutathione peroxidase; GR, glutathione reductase; GSH, reduced glutathione; H2DCF-DA, 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate; IC20, 20% inhibitory concentration; IC50, 50% inhibitory concentration; KCl, potassium chloride; Ki, inhibition constant; LETM1, leucine zipper-EF-hand-containing transmembrane protein1; MCU, mitochondrial calcium uniporter; MS-222, tricaine methanesulfonate; mtDNA, mitochondrial DNA; NO, nitric oxide; NOS, nitric oxide synthase; RC, respiratory control; ROS, reactive oxygen species; SNAP, S-nitroso-N-acetylpenicillamine; SOD, superoxide dismutase; TCA-cycle, tricarboxylic acid cycle; TEPP, tetraethyl pyrophosphate; TMPD, Tetramethyl-*p*-phenylenediamine; VDACS, voltage-dependent anion channels; WHO, World Health Organization; zbAChE, zebrafish acetylcholinesterase.

\* Corresponding author: Universidade Federal de Pernambuco – UFPE, Departamento de Bioquímica, Av. Prof. Moraes Rego, Campus Universitário, Recife, PE, Brazil.

**E-mail addresses:** [rafaeldavidbio@gmail.com](mailto:rafaeldavidbio@gmail.com) (R.D.S. Azevedo), [kivialfalcao@gmail.com](mailto:kivialfalcao@gmail.com) (K.V.G. Falcão), [caiodias2@hotmail.com](mailto:caiodias2@hotmail.com) (C.R.D. Assis), [regildo\\_max@hotmail.com](mailto:regildo_max@hotmail.com) (R.M.G. Martins), [marlyete.chagas@hotmail.com](mailto:marlyete.chagas@hotmail.com) (M.C. Araújo), [gilvan.yogui@ufpe.br](mailto:gilvan.yogui@ufpe.br) (G.T. Yogui), [jorge.neves.de@gmail.com](mailto:jorge.neves.de@gmail.com) (J.L. Neves), [seabra@cop.ufl.edu](mailto:seabra@cop.ufl.edu) (G.M. Seabra), [mbsm@ufpe.br](mailto:mbsm@ufpe.br) (M.B.S. Maia), [ianamaral@yahoo.com.br](mailto:ianamaral@yahoo.com.br) (I.P.G. Amaral), [anacatarinar@gmail.com](mailto:anacatarinar@gmail.com) (A.C.R. Leite), [ransoube@uol.com.br](mailto:ransoube@uol.com.br) (R.S. Bezerra).

<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.128029>

0045-6535/© 2020 Elsevier Ltd. All rights reserved.

### 3 – Binding Mechanism between Acetylcholinesterase and drugs Pazopanib and Lapatinib: Biochemical and Biophysical Studies

ACS Chemical  
Neuroscience

pubsacs.org/chemneuro

Research Article

## Binding Mechanism between Acetylcholinesterase and Drugs Pazopanib and Lapatinib: Biochemical and Biophysical Studies

Thaís Meira Menezes, Caio Assis, Alcides Jairon Lacerda Cintra, Roberto Carlos Silva dos Santos, Wilka Karla Martins do Vale, Regildo Max Gomes Martins, Ranilson de Souza Bezerra, Gustavo de Miranda Seabra, Chenglong Li, and Jorge Luiz Neves\*

Cite This: *ACS Chem. Neurosci.* 2021, 12, 4500–4511

Read Online

ACCESS |

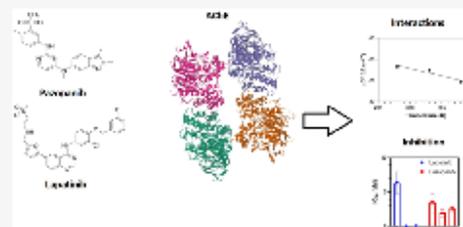
Metrics & More

Article Recommendations

Supporting Information

**ABSTRACT:** Tyrosine kinase inhibitors (TKIs) are antitumor compounds that prevent the phosphorylation of proteins in a biological environment. However, the multitarget performance of TKIs promotes them as possible candidates for drug repositioning. In this work, interaction and inhibition studies through spectroscopic and computational techniques to evaluate the binding effectiveness of lapatinib and pazopanib TKIs to acetylcholinesterase (AChE) are reported. The results indicated potent inhibition at the  $\mu\text{M}$  level. The types of inhibition were identified, with pazopanib acting through non-competitive inhibition and lapatinib through a competitive inhibition. The fluorescence suppression studies indicate a static mechanism for lapatinib–AChE and pazopanib–AChE systems, with a binding constant in the order of  $10^5 \text{ M}^{-1}$ . The obtained thermodynamic parameters reveal interactions driven by van der Waals forces and hydrogen bonds in the lapatinib–AChE system ( $\Delta H^\circ$  and  $\Delta S^\circ < 0$ ). In contrast, the pazopanib–AChE system shows positive  $\Delta H^\circ$  and  $\Delta S^\circ$ , characteristic of hydrophobic interactions. The Foster resonance energy transfer study supports the fluorescence studies performed. The 3D fluorescence studies suggest changes in the microenvironment of the tryptophan and tyrosine residues of the protein in contact with lapatinib and pazopanib. The results suggest effective inhibition and moderate interaction of the drugs with AChE, making them interesting for conducting more in-depth repositioning studies as AChE inhibitors.

**KEYWORDS:** fluorescence quenching, pazopanib, lapatinib, TKI inhibitors, acetylcholinesterase, enzyme inhibition, interactions



#### 1. INTRODUCTION

The acetylcholinesterase (AChE) enzyme has a unique role in neuronal signaling, considering its catalytic function acting on the neurotransmitter acetylcholine (ACh) hydrolysis, directly interfering with the transmission of nerve impulses in the brain.<sup>1</sup> Besides its importance in cholinergic functions, AChE also influences the cell differentiation, proliferation, and adhesion,<sup>2</sup> amyloid protein deposition in organs,<sup>3</sup> apoptosis,<sup>4</sup> and the formation of tumors.<sup>5</sup> The mechanisms involved in developing neurodegenerative diseases such as Alzheimer's disease (AD) are not clearly understood. However, the theory most explored by researchers developing AD drugs focuses on the cholinergic hypothesis, ACh deficiency in the nervous system.<sup>6,7</sup> Although studies on AD involve different proteins, possible therapeutic molecular targets, all drugs currently approved for AD control have been developed focusing on AChE inhibition,<sup>8</sup> and the only exception being the recent FDA approval of aducanumab (Aduhelm-Biogen), the first approved drug to explore the amyloid hypothesis.<sup>9</sup> Apart from aducanumab, there are currently only five approved drugs for

AD treatment, and 121 are undergoing clinical trials, among which 52 are repositioned drugs.<sup>10</sup>

Research on the discovery of multitarget drugs is growing, both in design and development and in understanding the molecular mechanism behind the therapeutic effect.<sup>11,12</sup> A series of antitumor drugs with assorted molecular targets have been found to have the power to inhibit AChE,<sup>13</sup> highlighting the relationship between cancer and this enzyme.<sup>14</sup> The performance of protein tyrosine kinases—enzymes targeted by antitumor compounds—is also reported in the literature of drug development for neurodegenerative diseases,<sup>15</sup> where, in studies for the treatment of AD, tyrosine kinase inhibitory molecules (TKIs) showed a neuroprotective effect<sup>16</sup> in

Received: August 3, 2021  
Accepted: November 11, 2021  
Published: November 22, 2021



ACS Publications

© 2021 American Chemical Society 4500

https://doi.org/10.1021/acschemneuro.1c00521  
*ACS Chem. Neurosci.* 2021, 12, 4500–4511

## 4 – Molecular Docking *in silico* Analysis of Brazilian Essential Oils Against Host Targets and SARS-CoV-2 Proteins

### Article

<https://dx.doi.org/10.21577/0103-5053.20220043>

J. Braz. Chem. Soc., Vol. 00, No. 00, 1-17, 2022  
©2022 Sociedade Brasileira de Química



### Molecular Docking *in silico* Analysis of Brazilian Essential Oils Against Host Targets and SARS-CoV-2 Proteins

Rêmulo B. G. M. Costa,<sup>a,□</sup> Regildo M. G. Martins,<sup>b</sup> Gerlane S. de Lima,<sup>c</sup>  
Thayza C. M. Stamford,<sup>d</sup> Wanderli P. Tadei,<sup>1,e</sup> Maria Aparecida M. Maciel,<sup>\*a,□</sup>  
Amália C. M. do Rêgo<sup>a</sup> and Francisco H. Xavier-Júnior<sup>f</sup>

<sup>a</sup>Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Potiguar (UnP),  
Campus Salgado Filho, 59075-000 Natal-RN, Brazil

<sup>b</sup>Programa Multi-Institucional de Pós-Graduação em Biotecnologia (PPGBIOTEC),  
Universidade Federal do Amazonas (UFAM), 69077-000 Manaus-AM, Brazil

<sup>c</sup>Departamento de Nutrição, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), 50670-901 Recife-PE, Brazil

<sup>d</sup>Departamento de Medicina Tropical, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), 50670-901 Recife-PE, Brazil

<sup>e</sup>Laboratório de Malária e Dengue, Instituto Nacional de Pesquisas Amazônicas (INPA), 69060-001 Manaus-AM, Brazil

<sup>f</sup>Laboratório de Biotecnologia Farmacêutica, Universidade Federal da Paraíba (UFPB),  
58051-900 João Pessoa-PB, Brazil

The inhibitory activity of thirty-one sesquiterpenes identified from Brazilian essential oils (*Copaifera langsdorffii* Desf., *Croton cajucara* Benth. and *Siparuna guianensis* Aublet.) were analyzed by *in silico* molecular docking. The compounds were characterized by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) and gas chromatography with flame-ionization detection (GC-FID), and then, applied against severe acute respiratory syndrome coronavirus-2 (SARS-CoV-2) proteins and human angiotensin-converting enzyme 2 (hACE2). Applying molecular docking and AutoDock Vina software, a total of 496 individual interactions were detected for sesquiterpenes along with SARS-CoV-2 proteins and hACE2 human angiotensin converting enzyme-2 protein. The findings showed considerable binding affinity of sesquiterpenes with the tested macromolecules. In that,  $\beta$ -selinene from *C. langsdorffii* displayed the best energy ( $-7.2 \text{ kcal mol}^{-1}$ ) and showed strong interactions with the amino acids of the SARS-CoV-2 M-Pro protein. Spathulenol from *C. cajucara* strongly interacted with human ACE2, with a binding energy of  $-7.1 \text{ kcal mol}^{-1}$ . Meanwhile,  $\gamma$ -eudesmol from *S. guianensis* presented the lowest binding energy ( $-7.5 \text{ kcal mol}^{-1}$ ) by interacting with the SARS-CoV-2 M-Pro complex. Additionally, measurements were performed aiming to evaluate the best sesquiterpenes binding interactions with the main proteins and its homologue files. According to results, these Brazilian essential oils hold antiviral potential being a rich source for further *in vitro* and *in vivo* studies focusing on herbal therapeutic adjuvants against SARS-CoV-2 infections.

**Keywords:** SARS-CoV-2 infection, molecular docking, *Copaifera langsdorffii* Desf., *Croton cajucara* Benth., *Siparuna guianensis* Aublet., sesquiterpenes essential oils

### Introduction

Severe acute respiratory syndrome coronavirus-2 (SARS-CoV-2) type has been spreading throughout the world since the end of 2019, when the first infections

were reported from China.<sup>1,2</sup> By mid-December of 2021, the World Health Organization reported over 271 million infected people worldwide and about 5.31 million deaths due to the complications of the COVID-19 (coronavirus disease 2019) infection.<sup>3</sup> SARS-CoV-2 is a virus from the Coronaviridae family, belonging to the  $\beta$ -coronaviruses lineage B, and represents one of the seven coronaviruses able to infect humans.<sup>2</sup> It is a single-stranded ribonucleic acid (RNA) genome virus, encapsulated by a membrane

\*e-mail: mammaciel@quimica.ufpb.br, mammaciel@hotmail.com

<sup>1</sup>In memoriam

Editor handled this article: José Walkimar M. Carneiro