

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

FELIPE ROCHA

PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE  
BETACAROTENO E ANÁLISE *IN VITRO* DA MODULAÇÃO DA  
ATIVIDADE ENZIMÁTICA EM MOSCAS DA ESPÉCIE *Drosophila*  
*melanogaster*

CAMPO MOURÃO

2018

FELIPE ROCHA

**PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE  
BETACAROTENO E ANÁLISE *IN VITRO* DA MODULAÇÃO DA  
ATIVIDADE ENZIMÁTICA EM MOSCAS DA ESPÉCIE *Drosophila  
melanogaster***

Exame de Defesa apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos da Universidade Tecnológica Federal do Paraná como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Tecnologia de Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Odinei Hess Gonçalves

Co-orientador: Prof. Dr. Rafael Porto Ineu

CAMPO MOURÃO

2018



Ministério da Educação

Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos

**PPGTA** UTFPR  
Programa de Pós-Graduação  
em Tecnologia de Alimentos

## TERMO DE APROVAÇÃO

# **PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE BETACAROTENO E ANÁLISE *IN VITRO* DA MODULAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA EM MOSCAS DA ESPÉCIE *Drosophila melanogaster***

Por

**FELIPE ROCHA**

Essa dissertação foi apresentada às 14 horas, do dia 7 de Junho de 2018, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Tecnologia de Alimentos, Linha de Pesquisa Processos Tecnológicos na Indústria de Alimentos, no Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos - PPGTA, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná. O(A) candidato(a) foi arguido(a) pela Banca Examinadora composta pelos professores abaixo assinados. Após deliberação, a Banca Examinadora considerou o trabalho APROVADO.

Prof. Dr. Rafael Porto Ineu \_\_\_\_\_ (Coorientador(a) – PPGTA)

Prof(a). Dr(a). Ângela Maria Gozzo \_\_\_\_\_ (Membro Externo – UTFPR)

Prof(a). Dr(a). Leila Larisa Marques Medeiros \_\_\_\_\_ (Membro Externo – UTFPR)

Prof, Dr. Bruno Ambrósio da Rocha \_\_\_\_\_ (Membro Externo – Faculdades Adamantinas Integradas)

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

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

R672p Rocha, Felipe

Produção e caracterização de nanopartículas de betacaroteno e análise *in vitro* da modulação da atividade enzimática em moscas da espécie *Drosophila melanogaster* / Felipe Rocha – 2018.

42 f.: il.; 30 cm.

Orientador: Odinei Hess Gonçalves

Coorientador: Rafael Porto Ineu

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

Inclui bibliografias.

1. Morfologia. 2. Compostos bioativos. 3. Antioxidantes. 4. Alimentos – Dissertações. I. Gonçalves, Odinei Hess, orient. II. Ineu, Rafael Porto, Coorient. III. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos. IV. Título.

CDD: 664

Biblioteca Câmpus Medianeira

Marci Lucia Nicodem Fischborn CRB 9/1219

## AGRADECIMENTOS

A Deus e ao meu anjo da guarda, por todas as bênçãos e proteções concedidas durante toda a caminhada até aqui. Aos meus pais, Maria de Fátima da Rocha e Marcos Pereira da Rocha, e minha tia Cleonice Rocha pelo apoio.

Aos meus amigos queridos e amados que fiz em Campo Mourão e se tornaram irmãos durante essa caminhada, muito obrigado por tudo, não poderia ter seguido sem vocês.

Ao meu orientador Professor Dr. Odinei Hess Gonçalves e meu coorientador Dr. Rafael Porto Ineu, pela paciência, dedicação, profissionalismo e confiança que tornou a elaboração deste estudo possível, meus sinceros agradecimentos. Aos professores da Universidade Tecnológica Federal do Paraná *Campus* Campo Mourão e aos professores do programa de pós-graduação em Tecnologia de Alimentos, agradeço pela contribuição para minha formação acadêmica.

Agradeço a todos que de uma maneira ou de outra contribuíram para que minha caminhada fosse possível. Muito obrigado.

## RESUMO

O betacaroteno é um carotenoide precursor da vitamina A, conhecido pela sua atividade biológica como, por exemplo, suas propriedades antioxidantes que auxiliam na redução do estresse oxidativo celular. Como o betacaroteno é altamente hidrofóbico, a sua transformação em nanopartículas, processo também chamado de nanonização, pode ser uma alternativa promissora para aumentar sua solubilidade em água e, portanto, sua atividade em meio aquoso. O objetivo do presente trabalho foi produzir nanopartículas de betacaroteno pela técnica de dispersão sólida, caracterizá-las e avaliar sua atividade biológica. Foi avaliada a influência sobre as enzimas glutationa-S-transferase (GST), relacionadas ao estresse oxidativo, e acetilcolinesterase (AChE), relacionada a doenças como Alzheimer e funções cognitivas. Como fonte das enzimas foi utilizado tecido de moscas da espécie *Drosophila melanogaster* nos ensaios *in vitro*. As técnicas de Microscopia Eletrônica de Transmissão e Espalhamento Dinâmico de Luz foram aplicadas para analisar a morfologia das nanopartículas, enquanto a Calorimetria Diferencial de Varredura foi realizada para avaliar o comportamento térmico do betacaroteno na forma convencional e nanoparticulada. Utilizou-se a difração de raios-X para analisar a cristalinidade dos compostos e a Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier foi utilizada para avaliar a interação entre os compostos nas nanopartículas. Os resultados mostraram a formação de cristais nanométricos de betacaroteno com estabilidade coloidal em água e que não ocorreram interações químicas entre o betacaroteno e a poli(vinil pirrolidona). Ainda foi possível observar que o processo de nanonização não afetou a estrutura cristalina do betacaroteno. Nos ensaios enzimáticos *in vitro*, as nanopartículas modularam significativamente a atividade biológica da enzima GST, causando um aumento da atividade enzimática em baixas concentrações e diminuição da atividade da enzima para concentrações maiores. Além disso, foi observada uma

diminuição da atividade da enzima AChE em meio aquoso em concentrações bem menores quando comparadas com o betacaroteno em água.

Palavras-chave: *dispersão sólida, poli(vinil pirrolidona), estresse oxidativo, morfologia.*

## ABSTRACT

Betacarotene is a carotenoid precursor of vitamin A, known by its biological activity such as the ability to reduce cell oxidative stress. Since betacarotene is highly hydrophobic, its transformation in nanoparticles, also called nanonization, may be a promising alternative to improve its water affinity and thus its activity in aqueous systems. The aim of this work was to produce betacarotene nanoparticles by solid dispersion method, carry out their characterization and to evaluate its modulation on biological activities of enzymes acetylcholinesterase (AChE) and glutathione S-transferase (GST) through *in vitro* assays using *Drosophila melanogaster* tissue as source of the enzymes mentioned above. AChE is related to like Alzheimer's disease and cognitive functions and GST is related to cell oxidative stress. Transmission Electronic Microscopy and Dynamic Light Scattering were performed to evaluate the morphology of the nanoparticles. Differential Scanning Calorimeter was used to analyze thermal behavior of pristine and nanoparticulated betacarotene. X-Ray diffraction was used to observe crystallinity and Fourier Transformed Infrared to evaluate chemical interactions between the compounds of the nanoparticles. Gathered results showed that nanometric betacarotene crystals formed were colloidally stable in water and there was not any chemical interaction between betacarotene and polyvinylpyrrolidone. Also, nanonization process did not affect crystalline structure of betacarotene. When dispersed in water, the nanoparticles were able to modulate the action of GST, causing an increase in the enzyme activity in lower concentrations and a decrease in the activity of the enzyme for higher concentrations. Moreover, the nanoparticles caused a decrease of the enzyme activity of AChE in lower concentrations when compared to pristine betacarotene in water.

**Keywords:** *solid dispersion, polyvinylpyrrolidone, oxidative stress, morphology.*

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura química do betacaroteno.....	13
Figura 2 – Estrutura química da poli(vinil pirrolidona).....	15
Figura 3 – Atuação das enzimas glutathiona reduzida (GSH) e glutathiona-S-transferase sobre alguns compostos tóxicos ao organismo.....	17
Figura 4 – Reação do neurotransmissor acetilcolina (ACh) junto à enzima acetilcolinesterase (AChE) na presença e na ausência de um inibidor enzimático.....	18
Figura 5 – Nanopartículas de betacaroteno diluídas em água e betacaroteno livre disperso em água nas concentrações de 1 mg.mL <sup>-1</sup> de betacaroteno.....	23
Figura 6 – Imagens das nanopartículas de betacaroteno obtidas por Microscopia de Transmissão Eletrônica.....	24
Figura 7 – Distribuição de tamanhos das nanopartículas de betacaroteno por intensidade.....	24
Figura 8 – Termograma dos compostos poli(vinilpirrolidona) (PVP), betacaroteno puro (BC), mistura física na proporção 10:1 de PVP e BC, respectivamente (MF 10:1), nanopartículas de betacaroteno (NP betacaroteno).....	25
Figura 9 - Termograma das misturas físicas entre poli(vinilpirrolidona) e betacaroteno livre nas proporções, respectivamente, nas proporções de 2:1, 5:1, 10:1 e 15:1 .....	26
Figura 10 – Espectros de Infravermelho com Transformada de Fourier do betacaroteno puro, do PVP puro, da mistura física (10:1 m/m) e das nanopartículas de betacaroteno em PVP.....	27

Figura 11 – Espectro de Infravermelho com Transformada de Fourier das misturas físicas de PVP e betacaroteno, respectivamente, nas proporções de 2:1, 5:1, 10:1 e 15:1..	28
Figura 12 – Difração de Raios-X dos compostos poli(vinilpirrolidona) (PVP), betacaroteno puro (BC), mistura física na proporção 10:1 de PVP e BC, respectivamente (MF 10:1) e das nanopartículas de betacaroteno (NP).....	29
Figura 13 - Modulação da atividade enzimática da enzima Glutathione-S-transferase pelas nanopartículas de betacaroteno e pelo betacaroteno livre em água em relação ao controle.....	30
Figura 14 - Modulação da atividade enzimática da enzima Acetilcolinesterase pelas nanopartículas de betacaroteno e pelo betacaroteno livre em água em relação ao controle.....	31

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Entalpias e temperaturas de fusão dos compostos betacaroteno puro (BC), poli(vinil pirrolidona) (PVP), mistura físicas (MF) nas proporções 2:1, 5:1, 10:1 e 15:1 de poli(vinil pirrolidona) e betacaroteno (BC), respectivamente, e das nanopartículas de betacaroteno .....	26
---	----

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	8
2. OBJETIVO GERAL E OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	10
2.1 Objetivo Geral.....	10
2.2 Objetivos específicos.....	10
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	11
3.1 Compostos bioativos em alimentos.....	11
3.2 Carotenoides.....	11
3.2.1 Betacaroteno.....	12
3.2.1.1 Atividade biológica do betacaroteno.....	13
3.2.1.2 Nanopartículas de betacaroteno.....	14
3.3 Enzimas glutathione-S-transferase e acetilcolinesterase.....	16
4. METODOLOGIA.....	19
4.1 Materiais.....	19
4.2 Produção das nanopartículas.....	19
4.3 Caracterização das nanopartículas.....	20
4.4 Análises <i>in vitro</i> .....	21
4.4.1 Preparação de homogeneizado.....	21
4.4.2 Determinação de proteína.....	21
4.4.3 Atividade da enzima glutathione S-transferase (GST).....	21
4.4.4 Atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE).....	22
4.5 Análise estatística.....	22
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	23
5.1 Caracterização das nanopartículas.....	23
5.2 Atividade enzimática.....	30
6. CONCLUSÕES.....	33
7. REFERÊNCIAS.....	34

## 1. INTRODUÇÃO

O consumo de compostos bioativos é importante na manutenção do equilíbrio do estado redox das células. Os sistemas de proteção antioxidantes endógeno e exógeno atuam de forma sinérgica a fim de neutralizar os radicais livres naturalmente produzidos em organismos aeróbicos (KALIORA, DEDOUSSIS, & SCHMIDT, 2006). Os carotenoides estão entre os compostos bioativos mais conhecidos (MARSANASCO et al., 2015).

O betacaroteno é um pigmento natural e o mais abundante do grupo dos carotenoides e está presente nos alimentos, especialmente em vegetais e frutas de cor amarelo-alaranjada e em vegetais folhosos de cor verde-escura. Nestes, a cor natural do carotenoide é mascarada pela clorofila presente nos cloroplastos (RODRIGUEZ-AMAYA, 2010). No corpo humano, o betacaroteno auxilia na comunicação intracelular, inibe a proliferação de células e modula suas diferenciações (BENDICH, 2004; RUTKOWSKI; GRZEGORCZYK, 2012). O composto é capaz de neutralizar radicais livres, inibindo sua propagação e participação em processos peroxidativos. A relação entre carotenoides, estresse oxidativo e processos inflamatórios tem sido mostrada em estudos *in vitro*, especialmente os que incluem modelos celulares (KAULMANN; BOHN, 2014; GUL et al., 2015).

De acordo com Gul et al. (2015), o betacaroteno é facilmente oxidado quando exposto à presença de oxigênio, luz e altas temperaturas durante o processamento e armazenamento. Segundo Rein et al. (2013), a biodisponibilidade do betacaroteno advindo de frutos e vegetais em humanos é relativamente baixa. Assim, alguns processos tecnológicos são capazes de aumentar a biodisponibilidade dos carotenoides, como encapsulação e transformação em nanopartículas, conhecido como nanonização (NWACHUKWU; UDENIGWE; ALUKO, 2016).

A técnica de dispersão sólida é uma alternativa para aumentar a taxa de dissolução, solubilidade e absorção oral de compostos hidrofóbicos, onde uma maior solubilidade está relacionada a um menor tamanho das partículas do composto (SAREEN; JOSEPH; MATHEW, 2012). Chiou e Riegelman (1969) definem a dispersão sólida como sistemas de pelo menos dois componentes diferentes, onde geralmente a matriz é hidrofílica e o composto é hidrofóbico e a

matriz pode ser cristalina ou amorfa. Como a poli(vinil pirrolidona) (PVP) é um polímero não tóxico e biocompatível, é considerado um material promissor na indústria biotecnológica (GUPTA; CHEN; LEE, 2015), e contém grupos hidrofóbicos e hidrofílicos em sua estrutura, sendo um solvente sólido para o betacaroteno. Ele atua concomitantemente como um agente estabilizante em solução aquosa, possuindo a capacidade de dissolver o betacaroteno e proteger o composto em dispersão aquosa, formando uma estrutura coloidal (TACHIBANA; NAKAMURA, 1965).

A fim de avaliar o efeito do betacaroteno na forma de nanopartículas em relação às enzimas glutathione-S-transferase e acetilcolinesterase, animais invertebrados, como a mosca da espécie *Drosophila melanogaster*, é um modelo de estudo eficiente. É considerada uma poderosa ferramenta genética para a compreensão de problemas biológicos complexos, além de possuir grande similaridade com a sequência genética humana (PANDEY e NICHOLS, 2011).

As enzimas glutathione-S-transferases (GSTs) são essenciais na detoxificação intracelular, além de possuírem a função de catalisar a conjugação da molécula glutathione a outras moléculas (RAUCH; NAUEN, 2004). A acetilcolina (ACh) é um neurotransmissor presente em todo o sistema nervoso e amplamente distribuída por todo o cérebro, sendo encontrada em menor quantidade no cerebelo. A enzima acetilcolinesterase, por sua vez, hidrolisa a acetilcolina em colina e acetato e sua atividade está relacionada ao controle de doenças como Alzheimer e funções cognitivas (DARVESH et al., 2003; VINUTHA et al., 2007).

Tendo em vista a natureza hidrofóbica do betacaroteno, torna-se interessante avaliar a sua atividade biológica quando este se apresenta na forma de nanopartículas, haja vista a possibilidade de aumento da sua eficácia em meio aquoso.

## **2. OBJETIVO GERAL E OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

### **2.1 Objetivo geral**

Produzir e caracterizar nanopartículas de betacaroteno e avaliar sua modulação na atividade enzimática em relação às enzimas glutathione-S-transferase e acetilcolinesterase, utilizando tecido de moscas da espécie *Drosophila melanogaster*.

### **2.2 Objetivos específicos**

- Produzir nanopartículas de betacaroteno pela técnica de dispersão sólida;
- Avaliar as características morfológicas, comportamento térmico, cristalinidade e interações químicas entre os compostos das nanopartículas;
- Analisar a modulação da atividade biológica das enzimas glutathione-S-transferase e acetilcolinesterase com nanopartículas de betacaroteno em análises *in vitro* com tecido homogeneizado de moscas da espécie *Drosophila melanogaster*.

### **3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

#### **3.1 Compostos bioativos em alimentos**

Os compostos bioativos mais conhecidos são os ácidos graxos essenciais (ômega-3 e -6, por exemplo), tocoferol, flavonoides, polifenóis, fitoesteróis, vitaminas lipossolúveis e carotenoides (MARSANASCO et al., 2015). Apesar de não serem denominados nutrientes por não serem considerados essenciais ao crescimento e às funções vitais, os compostos bioativos, como os carotenoides, podem atuar como antioxidantes no organismo (STAHL; SIES, 2003). Esses compostos possuem capacidade de competir por sítios ativos e receptores nas diversas estruturas celulares ou modulação de expressões de genes que codificam proteínas envolvidas em mecanismos intracelulares de defesa contra processos oxidativos de estruturas celulares (BASTOS; ROGERO; ARÊAS, 2009). Ainda, inibem a peroxidação de lipídios, podendo prevenir o aparecimento de algumas doenças como infarto do miocárdio, arteriosclerose, entre outras (DAIMIEL; VARGAS; MOLINA, 2012). O consumo desses compostos, portanto, é importante na manutenção do equilíbrio do estado redox das células, neutralizando radicais livres pela atuação sinérgica do sistema de proteção antioxidante endógeno e exógeno (KALIORA, DEDOUSSIS, & SCHMIDT, 2006).

#### **3.2 Carotenoides**

Carotenoides são pigmentos orgânicos lipossolúveis sintetizados geralmente em plantas superiores, algas e bactérias. Esses pigmentos apresentam um grupo variado de compostos importantes para a área farmacêutica, química e indústrias de alimentos devido ao seu efeito corante e ações benéficas no organismo humano, além de alguns carotenoides serem precursores da vitamina A (SANT'ANNA et al., 2013).

Os carotenoides são antioxidantes conhecidos por reagirem com o oxigênio singlete e radicais peroxil, assim ajudam a proteger as células de danos oxidativos causados por radicais livres que podem ser gerados no citoplasma, nas mitocôndrias ou nas membranas e podem atacar proteínas, carboidratos e DNA (SHAMI; MOREIRA, 2004). Os carotenoides são importantes na prevenção

de doenças associadas ao processo de estresse oxidativo como o câncer, catarata, arteriosclerose, além do retardo do processo de envelhecimento, agindo como parte do sistema de defesa antioxidante (RIBEIRO; SERAVALLI, 2004). Segundo Stahl e Sies (2003), os carotenoides interagem sinergicamente com outros antioxidantes, assim uma mistura desses compostos é mais efetiva em relação à atividade antioxidante no organismo.

Estruturalmente, a maioria dos carotenoides são derivados de uma estrutura principal de 40 carbonos, que contém um sistema de duplas ligações conjugadas (STAHL; SIES, 2003). Essas ligações duplas conjugadas presentes na estrutura química dos carotenoides absorvem a luz dentro da região visível, fornecendo uma coloração que varia do amarelo pálido ao laranja ou vermelho escuro (MATTEA; MARTÍN; COCERO, 2009). Esses compostos podem ser divididos em 2 grupos: os carotenos, que contêm apenas átomos de carbono e hidrogênio, e as xantofilas, que possuem pelo menos um átomo de oxigênio em sua estrutura (STAHL; SIES, 2003).

### **3.2.1 Betacaroteno**

O betacaroteno é encontrado, principalmente, em vegetais e frutas de cor amarelo-alaranjada e em vegetais folhosos de cor verde-escura. Nestes, a cor natural do carotenoide é mascarada pela clorofila, presente nos cloroplastos (RODRIGUEZ-AMAYA, 2010). Possui caráter altamente hidrofóbico devido à presença de duplas ligações conjugadas com um centro de simetria, estrutura essa também responsável pela cor característica do composto, como resultado da absorção de luz na região visível (KOHNO et al., 2016). O betacaroteno ainda é conhecido pela sua atividade antioxidante e também por ser precursor da vitamina A, sendo a maior fonte dessa vitamina em humanos (BURRI, 1997; HARRISON, 2012).

Ainda assim, a biodisponibilidade do betacaroteno originário de frutos e vegetais em humanos é geralmente baixa. Essa baixa disponibilidade pode ser explicada pela sua hidrofobicidade, além da resistência para digerir e degradar fibras e células das paredes dos vegetais (REIN et al., 2013; SAINI, NILE e PARK, 2015).

### 3.2.1.1 Atividade biológica do betacaroteno

É possível observar os anéis de  $\beta$ -ionona ligados à cadeia lateral poliênica na estrutura química do betacaroteno, sendo estes responsáveis pela atividade precursora de vitamina A do composto (Figura 1) (RODRIGUEZ-AMAYA, 1997). Estruturalmente, os anéis de  $\beta$ -ionona não substituíveis ligados à cadeia lateral poliênica torna possível a conversão metabólica do betacaroteno em vitamina A.

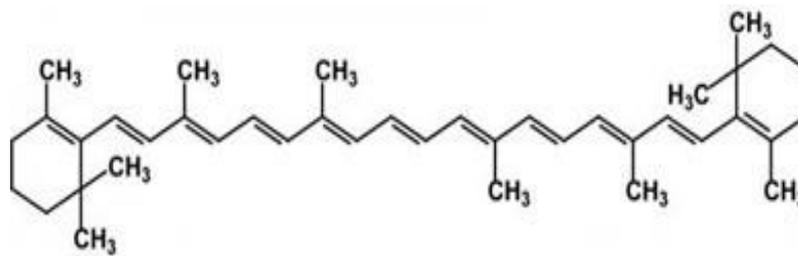


Figura 1 – Estrutura química do betacaroteno.

Fonte: Sigma-Aldrich.

Tang (2010) relata um fator de conversão do betacaroteno para vitamina A em humanos na proporção de 3,6:1 a 28:1 de betacaroteno e vitamina A, respectivamente. Segundo o autor, essa faixa de conversão varia de acordo com a fonte primária de betacaroteno e entre indivíduos.

No corpo humano, o betacaroteno auxilia na comunicação intracelular, inibe a proliferação de células e modula suas diferenciações. Ainda, por meio da ativação de interferões, ajuda a fortalecer o sistema imunológico (BENDICH, 2004; RUTKOWSKI; GRZEGORCZYK, 2012). A atividade antioxidante do betacaroteno ocorre devido à neutralização de espécies reativas oxigenadas e radicais livres, inibindo sua propagação e participação em processos peroxidativos. O betacaroteno também possui atividade antioxidante em baixa pressão parcial de oxigênio, prevalente em tecidos periféricos (KRINSKY, 2001; VALKO et al., 2007; RUTKOWSKI; GRZEGORCZYK, 2012). Alguns estudos também indicam a capacidade de o betacaroteno atuar na prevenção de doenças cardíacas (BURRI, 1997; CSEPANYI et al., 2015).

Kim, Seo e Kim (2011) encontraram uma redução de 10% de espécies reativas oxigenadas em células gástricas epiteliais humanas utilizando 20  $\mu$ M de betacaroteno no estudo, após estimulação com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Em estudo realizado por

Jang, Lim e Kim (2009) foi observada uma significativa redução de espécies reativas oxigenadas em células gástricas epiteliais infectadas com *Helicobacter pylori* para concentrações de 10 e 20  $\mu\text{M}$  de betacaroteno.

Estudos *in vivo* realizados por Kasperczyk et al. (2014) relataram uma significativa redução nos parâmetros de estresse oxidativo e elevados níveis de glutathiona em um grupo de pessoas tratadas com uma dose diária de 10 mg de betacaroteno durante um período de 12 semanas. Karamese et al. (2015) também encontraram diminuição nos parâmetros de estresse oxidativo em ratos tratados com doses de 50 a 100  $\text{mg.kg}^{-1}$  de betacaroteno via oral 30 minutos antes da injúria no tecido ovariano dos animais.

Dados disponíveis na literatura também relatam a capacidade de o betacaroteno atuar como antioxidante por si só, sendo capaz de neutralizar radicais livres (KIM; SEO; KIM, 2011; GUL et al., 2015).

### **3.2.1.2 Nanopartículas de betacaroteno**

Como o betacaroteno possui uma natureza altamente hidrofóbica e é facilmente oxidado quando exposto à presença de oxigênio, luz e calor (GUL et al., 2015; KOHNO et al., 2016), alguns processos tecnológicos, como a nanonização, podem exercer influência positiva na biodisponibilidade e estabilidade de carotenoides (NWACHUKWU et al., 2016).

Tachibana e Nakamura (1965) produziram nanopartículas de betacaroteno pela técnica de dispersão sólida por evaporação de solvente, utilizando PVP na proporção de 97,5% e 2,5% de betacaroteno e clorofórmio como solvente comum. Os autores encontraram estruturas coloidais nanométricas e prontamente dispersáveis em água.

A técnica de dispersão sólida tem como finalidade o aumento da taxa de dissolução, solubilidade e absorção oral de compostos hidrofóbicos, sendo que a solubilidade está amplamente relacionada com o tamanho das partículas do composto, obtendo maior solubilidade conforme redução nas dimensões das mesmas, permitindo maior área de contato superficial entre o composto e o solvente (SAREEN; JOSEPH; MATHEW, 2012). O método consiste na utilização de dois componentes, onde geralmente o composto a ser submetido ao processo

possui caráter hidrofóbico e a matriz, hidrofílico. A matriz ainda pode possuir estrutura amorfa ou cristalina (CHIOU E RIEGELMAN 1969).

A dispersão sólida pelo método de evaporação de solvente consiste na utilização de um solvente orgânico comum para a mistura sólida, onde o solvente deve ser não tóxico e facilmente evaporado, como o etanol, que permite o emprego de baixas temperaturas no processo de evaporação (SAREEN; JOSEPH; MATHEW, 2012). Segundo Salvia-Trujillo et al. (2013), um menor tamanho das partículas de um composto exerce uma influência positiva na biodisponibilidade do mesmo.

A poli(vinil pirrolidona) (PVP), por conter grupos hidrofóbicos e hidrofílicos, é um solvente sólido para o betacaroteno e atua concomitantemente como um agente estabilizante em solução aquosa, possuindo a capacidade de dissolver o betacaroteno em PVP e proteger o composto em dispersão aquosa (TACHIBANA; NAKAMURA, 1965). Segundo Gupta, Chen e Lee (2015), o PVP é um polímero não tóxico e biocompatível, considerado um material promissor na indústria biotecnológica. O uso do PVP para produção de nanopartículas e encapsulação de compostos bioativos pode ser observado em estudos recentes, como Silva et al. (2017), que encapsularam luteína utilizando PVP pela técnica de dispersão sólida e Reksamunandar et al. (2017), que produziram fibras nanométricas de betacaroteno utilizando PVP pela técnica de *electrospinning*.

É possível observar os grupos hidrofílicos (pirrolidona), e os grupos hidrofóbicos (alquila) na estrutura química do PVP, conforme a Figura 2.

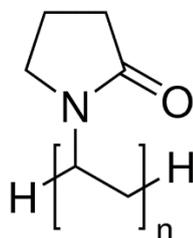


Figura 2 – Estrutura química do PVP.

Fonte: Sigma-Aldrich.

### 3.3 Enzimas glutathiona-S-transferase e acetilcolinesterase

Compostos químicos denominados xenobióticos podem agir de forma danosa ao organismo, assim as enzimas glutathiona-S-transferases agem como catalisadoras na eliminação desses compostos, tornando-os menos tóxicos e mais solúveis em água, por meio da biotransformação, facilitando a eliminação desses metabólitos. O mecanismo de ação da enzima se dá pela catalisação do ataque nucleofílico da glutathiona reduzida a esses compostos mencionados. Assim, as GSTs podem exercer um papel importante também na inativação de fármacos (TORRES; SOARES; MAIA, 2004; HUBER; ALMEIDA; DE FÁTIMA, 2008). A enzima glutathiona-S-transferase é uma das principais enzimas endógenas antioxidantes no organismo e está relacionada ao estresse oxidativo (RAUCH; NAUEN, 2004). Estudos *in vivo* têm relacionado o efeito do betacaroteno na atividade de enzimas relacionadas à glutathiona (MCGILL et al., 2003; KASPERCZYK et al., 2014)

O estudo realizado por Adedara et al. (2016) avaliou o efeito do composto disseleneto de difenila ( $10$  e  $20 \text{ mmol.kg}^{-1}$ ) após indução da toxicidade por manganês ( $30 \text{ mmol.kg}^{-1}$  de substrato) em moscas da espécie *Drosophila melanogaster*. Os autores observaram um aumento da atividade da enzima glutathiona-S-transferase neste estudo para ambas as concentrações avaliadas.

A Figura 3 apresenta o mecanismo de ação conjunta das enzimas glutathiona reduzida (GSH) e glutathiona-S-transferase sobre alguns compostos tóxicos ao organismo, onde podem ser observados a adição de um agrupamento SG pela enzima glutathiona ao composto e ligação de um átomo de hidrogênio ao átomo de oxigênio presente na estrutura, tornando-o menos reativo.

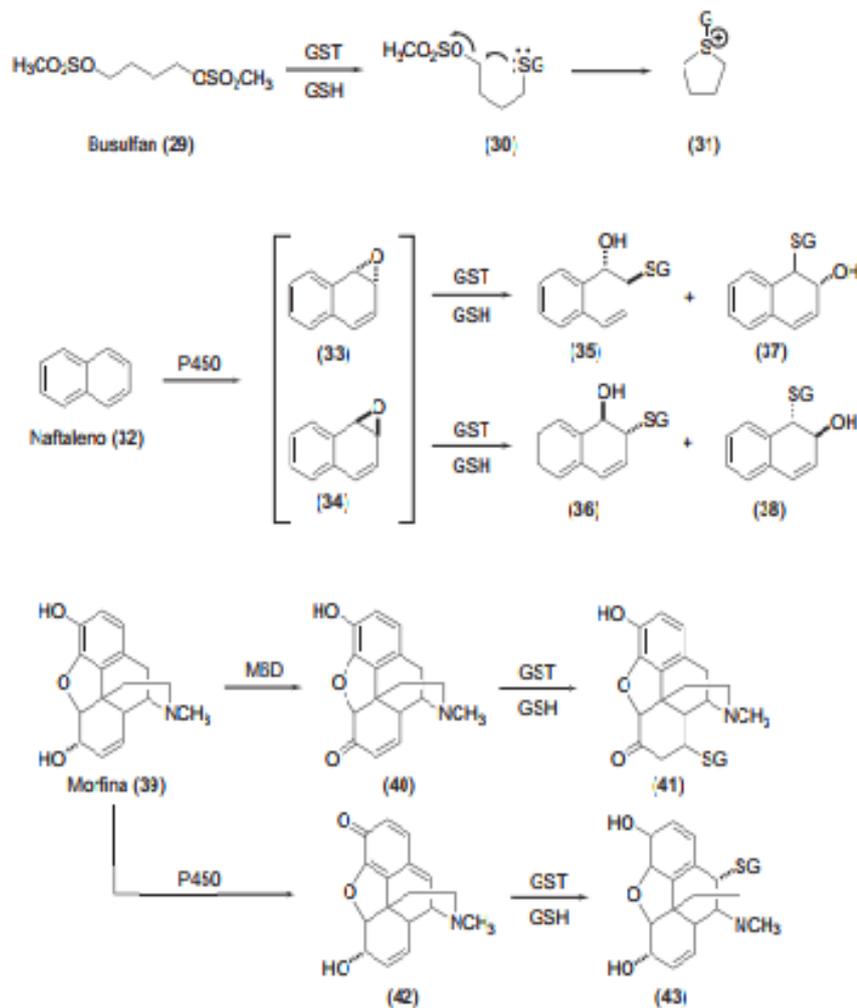


Figura 3 – Atuação das enzimas glutationa reduzida (GSH) e glutationa-S-transferase sobre alguns compostos tóxicos ao organismo.

Fonte: HUBER, ALMEIDA e DE FÁTIMA (2008).

A acetilcolina (ACh) é um neurotransmissor presente em todo o sistema nervoso e amplamente distribuída por todo o cérebro, sendo encontrada em menor quantidade no cerebelo. A enzima acetilcolinesterase hidrolisa a acetilcolina em colina e acetato e está relacionada a doenças como Alzheimer e funções cognitivas. Devido à especificidade da enzima pelo neurotransmissor acetilcolina, a inibição da atividade da enzima é uma forma de prolongar a vida útil do neurotransmissor, cuja diminuição está relacionada a doenças como Alzheimer e perda de funções cognitivas (DARVESH et al., 2003; VINUTHA et al., 2007). Araujo et al. (2015), por exemplo, avaliaram o efeito neuroprotetivo do

composto gama orizanol no modelo de Parkinson induzido por rotenona em moscas da espécie *Drosophila melanogaster*.

Diversos estudos têm pesquisado meios de inibir a atividade da enzima acetilcolinesterase em moscas da espécie *Drosophila melanogaster* com diferentes compostos, seja por meio da indução da toxicidade ou não (ADEDARA et al., 2016; AKINYEMI et al., 2017). Adedara et al. (2016) pesquisaram o efeito do composto disseleneto de difenila nas concentrações de 10 e 20 mmol.kg<sup>-1</sup> após indução da toxicidade utilizando manganês em uma concentração de 30 mmol.kg<sup>-1</sup> de substrato em moscas da espécie *Drosophila melanogaster*. Neste estudo, foi constatada reversão do aumento da atividade da enzima acetilcolinesterase causado pelo manganês para todas as concentrações testadas de disseleneto de difenila.

A Figura 4 mostra a exemplificação de uma sinapse colinérgica frente ao neurotransmissor acetilcolina (ACh) e a enzima acetilcolinesterase (AChE) na presença e na ausência de um inibidor enzimático da AChE.

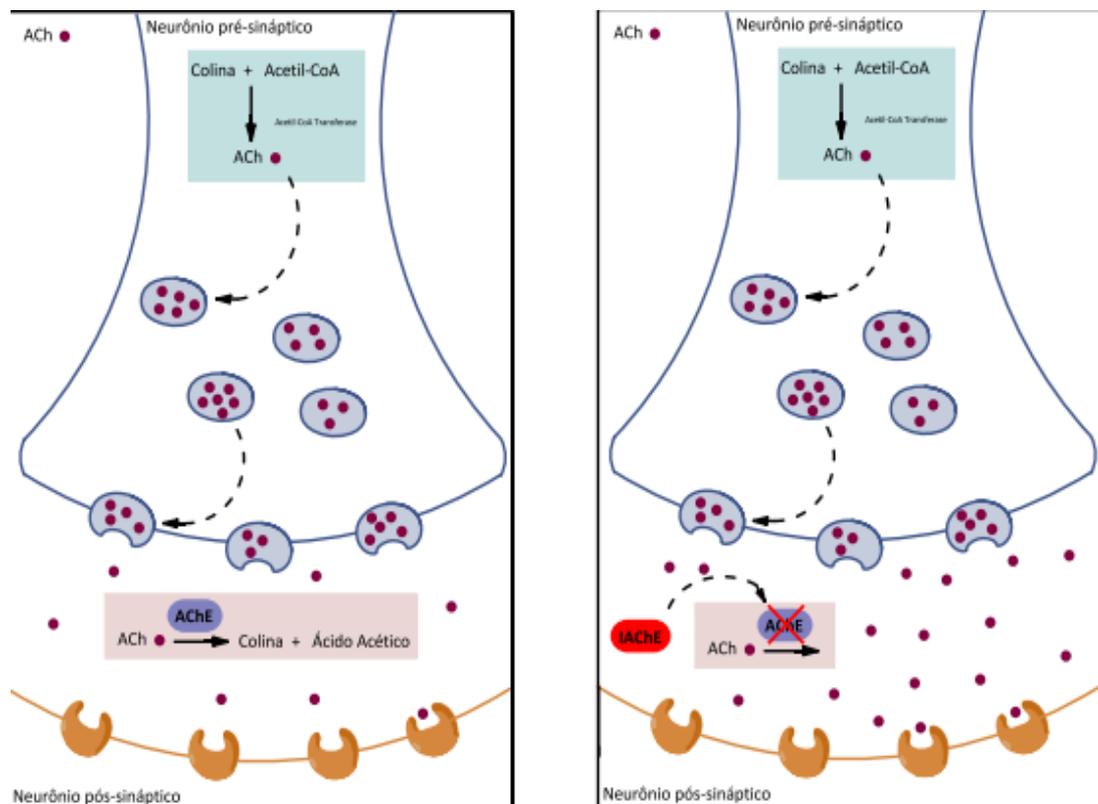


Figura 4 – Sinapse colinérgica sem (imagem esquerda) e com (imagem direita) inibidor da enzima acetilcolinesterase.

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

## 4. METODOLOGIA

### 4.1 Materiais

Betacaroteno (97% de pureza, Sigma-Aldrich), poli(vinil pirrolidona) (PVP, 40,000 g.mol<sup>-1</sup>, Sigma-Aldrich), Tween 80 (Dinâmica) e etanol (99,8%, Neon) foram utilizados na produção de nanopartículas. Brometo de Potássio (KBr) (Sigma-Aldrich, padrão espectroscópico) foi utilizado nas análises de Espectroscopia em Infravermelho. 1-Cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) (99%, Sigma-Aldrich), 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzóico) (DTNB) (98%, Sigma-Aldrich), Tris-HCl (Sigma-Aldrich), glutationa reduzida (GSH) (98%, Sigma-Aldrich) e acetiltiocolina (99%, Sigma-Aldrich) foram utilizados para os testes das atividades enzimáticas das enzimas glutationa-S-transferase (GST) e acetilcolinesterase (AChE) em ensaios *in vitro*. Corante azul brilhante (Sigma-Aldrich), etanol (99,8%, Neon) e ácido ortofosfórico (85%, Neon) foram utilizados na preparação do reagente Comassie para determinação de proteína nos tecidos utilizados nos ensaios *in vitro*. Fosfato de potássio monobásico e dibásico (99%, Dinâmica) foram utilizados para preparação no tampão fosfato de potássio (TFK).

### 4.2 Produção das nanopartículas de betacaroteno

As nanopartículas de betacaroteno foram obtidas por meio da técnica de dispersão sólida, conforme descrito por Silva et al. (2017). Tween 80 (75 mg) foi adicionado em etanol (37,5 mL), juntamente com poli(vinil pirrolidona) (900 mg) e betacaroteno (90 mg), sob agitação magnética por 5 minutos. Após a dissolução, a solução foi sonicada em banho de gelo durante 3 minutos, em pulsos 30 segundos ligados e 10 segundos desligado (Fisher Scientific, 120 W e probe de 1/8"). Em seguida, a solução foi colocada em estufa com circulação de ar a 60°C por 24 horas para evaporação do solvente. As nanopartículas foram preparadas de modo a se obter a proporção PVP : betacaroteno de 10:1 em massa.

### 4.3 Caracterização das nanopartículas

A distribuição de tamanho de partículas foi determinada por difração de laser (Malvern Mastersizer 3000) usando água como dispersante. Os parâmetros  $D_{10}$ ,  $D_{50}$  e  $D_{90}$  foram calculados a partir da distribuição de tamanhos em número e correspondem ao diâmetro de 10%, 50% e 90%, respectivamente, do total de nanopartículas utilizadas para análise.

A técnica de Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC, Perkin Elmer, DSC4000) foi empregada para avaliar as características térmicas dos compostos (PVP, betacaroteno, nanopartículas e das misturas físicas de PVP e betacaroteno, com fluxo de nitrogênio de  $50 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ , de 0 a  $300^\circ\text{C}$  a  $20^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ ).

Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR, Shimadzu, IRAffinity-1S) foi empregada para avaliar possíveis interações entre o PVP e o betacaroteno nas nanopartículas. As análises foram feitas com resolução de  $2 \text{ cm}^{-1}$ , de  $4500$  a  $500 \text{ cm}^{-1}$ , com 32 varreduras cumulativas e normalização dos picos.

A caracterização morfológica das nanopartículas foi realizada utilizando Microscopia de Eletrônica de Transmissão (TEM; JEOL modelo JEM 2100, 200 kV). Amostras diluídas foram gotejadas em porta-amostras de cobre de 300 mesh cobertas de parlódio e foram secos à temperatura ambiente. Difração de raios-X (DRX) foi feita em difratômetro de Raios-X (Bruker, D8 Advance) com faixa de escaneamento entre  $3^\circ$  e  $60^\circ$  ( $2\theta$ ) em fluxo de  $5.9^\circ\cdot\text{min}^{-1}$  e radiação  $\text{Cu K}\alpha$  gerado em 40 kV e 35 mA.

Nas análises de Calorimetria Diferencial por Varredura e Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier, o PVP foi removido das nanopartículas de acordo com a seguinte metodologia: as nanopartículas liofilizadas foram diluídas em água e colocada em vórtex por 1 minuto. Então, foram centrifugadas a 14.000 rpm por 30 minutos. O sobrenadante foi descartado e o processo foi repetido 4 vezes. Quando necessário, misturas físicas foram produzidas misturando-se manualmente PVP e betacaroteno nas proporções PVP : betacaroteno de 2:1, 5:1, 10:1 e 15:1 em massa a fim de comparar seu comportamento com as nanopartículas de betacaroteno.

#### **4.4 Análises *in vitro***

As análises enzimáticas *in vitro* foram realizadas com as nanopartículas de betacaroteno diluídas em água nas concentrações finais de 1 até 400 µM. Também foram avaliados os efeitos do betacaroteno e poli(vinil pirrolidona) diluídos em água.

##### **4.4.1 Preparação do homogeneizado para as análises biológicas**

100 moscas da espécie *Drosophila melanogaster* foram insensibilizadas em freezer e homogeneizadas manualmente em 1000 µL de solução Tris-HCl (50 mM, pH 7,0). Após centrifugação a 12.000 rpm por 10 minutos, foi recolhida uma alíquota de 1000 µL do sobrenadante e armazenada em ultrafreezer a - 80°C até as análises *in vitro*.

##### **4.4.2 Determinação de proteína**

A determinação de proteína foi feita conforme metodologia de Bradford (1976). 2,5 mL de Comassie foi adicionado a 50 µL de tecido homogeneizado de *Drosophila melanogaster* e a leitura foi feita em espectrofotômetro UV-Vis (OceanOptics modelo USB650) em 595 nm após 10 minutos.

##### **4.4.3 Atividade enzimática da enzima Glutathione-S-transferase (GST)**

O ensaio de atividade da GST foi feito utilizando 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB), conforme metodologia proposta por Habig, Pabst e Jakoby (1974), com algumas modificações. A solução contendo 520 µL de água destilada, 400 µL de TFK 0,1 M (pH 7,5), 50 µL de tecido homogeneizado de *Drosophila melanogaster* e 10 µL de dispersão de nanopartículas foi incubada por 2 minutos. Após incubação, 10 µL de glutathione reduzida (0,1 M) e 10 µL CDNB (0,1 M) foram adicionados e a leitura foi feita em espectrofotômetro UV-Vis (OceanOptics modelo USB650) em 340 nm por 4 minutos a cada 30 segundos. A atividade enzimática foi expressa em porcentagem (%) em relação

ao controle, onde a atividade enzimática do controle foi medida sem a adição das nanopartículas de betacaroteno.

#### **4.4.4 Atividade enzimática da enzima Acetilcolinesterase (AChE)**

A atividade da enzima acetilcolinesterase foi determinada de acordo com a metodologia de Ellman (1959), com algumas modificações. Foi preparada uma solução contendo 600 µL de água destilada, 100 µL de Tris-HCl (0,05 M e pH 7,4), 100 µL de ácido 5,5-ditiobis-2-nitrobenzóico (DTNB) 5 mM, 75 µL de tecido homogeneizado de *Drosophila melanogaster* e 25 µL de dispersão de nanopartículas e foi pré-incubada por 2 minutos à 24° C. Após a incubação, 100 µL de acetilcolina (8 mM) foi adicionado à solução e a leitura feita por 3 minutos em 420 nm a cada 30 segundos em espectrofotômetro UV-Vis (OceanOptics modelo USB650). A atividade enzimática foi expressa em porcentagem (%) em relação ao controle, onde a atividade enzimática do controle foi medida sem a adição das nanopartículas de betacaroteno.

#### **4.5 Análise estatística**

As análises estatísticas foram feitas no software GraphPad Prism versão 6.0, utilizando ANOVA de uma via ao nível e teste post-hoc de Tukey, a um nível de significância de 5%. Os dados foram expressos em média ± erro padrão.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 5.1 Caracterização das nanopartículas

A Figura 5 apresenta as nanopartículas de betacaroteno dispersas em água e o betacaroteno disperso em água nas concentrações de  $1 \text{ mg.mL}^{-1}$  de betacaroteno. A Figura 6 apresenta a Microscopia de Transmissão Eletrônica de nanopartículas de betacaroteno em água. A Figura 7 apresenta a distribuição de tamanhos das nanopartículas de betacaroteno.

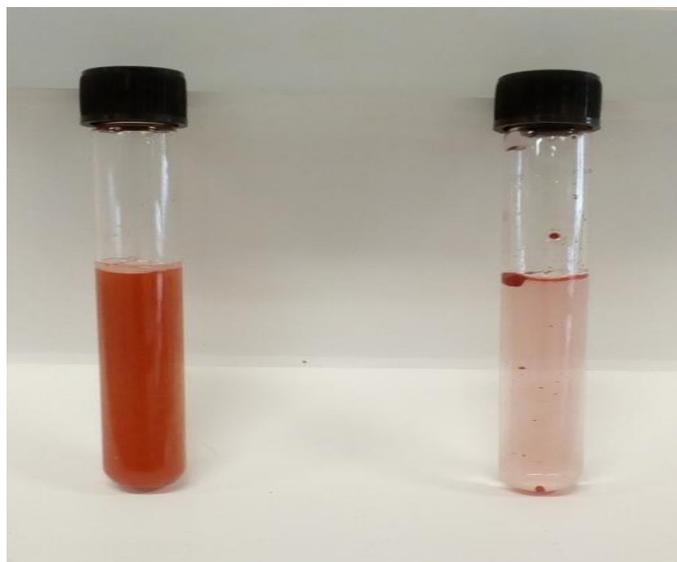


Figura 5 - Nanopartículas de betacaroteno dispersas em água (esquerda) e betacaroteno disperso em água (direita) nas concentrações de  $1 \text{ mg.mL}^{-1}$  de betacaroteno.

Fonte: autoria própria.

É possível notar um considerável aumento na solubilidade do betacaroteno na forma de nanopartículas em água quando comparado com o betacaroteno livre na forma convencional.

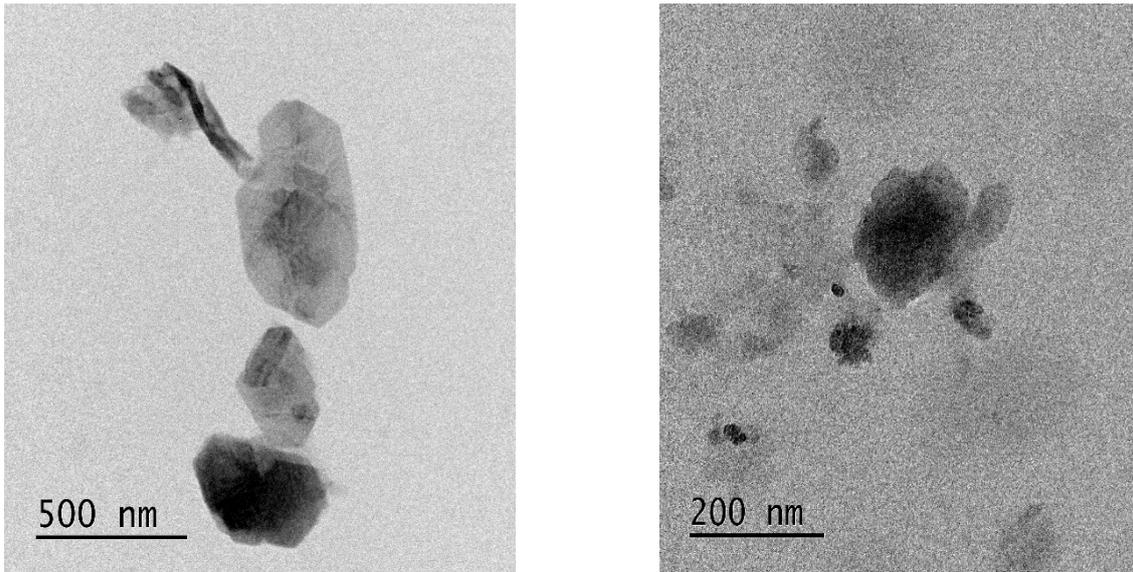


Figura 6 – Imagens obtidas por Microscopia de Transmissão Eletrônica das nanopartículas de betacaroteno.

Fonte: autoria própria.

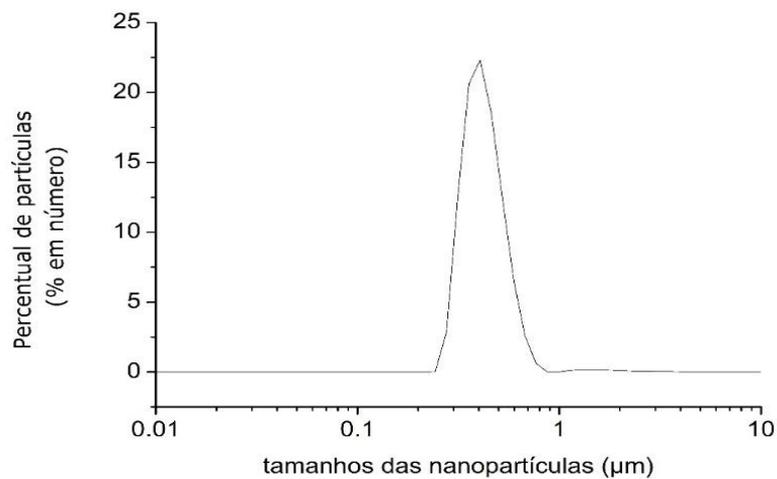


Figura 7 – Distribuição de tamanhos das nanopartículas de betacaroteno.

Fonte: autoria própria.

Pela Microscopia de Transmissão Eletrônica foram observados cristais nanométricos de betacaroteno. As nanopartículas formaram uma estrutura coloidal estável em água e é possível observar que as nanopartículas não possuem formato esférico, típico de estruturas cristalinas. Foram encontrados valores de  $D_{10}$ ,  $D_{50}$  e  $D_{90}$  de  $0,337 \pm 0,050$ ,  $0,439 \pm 0,045$  e  $0,602 \pm 0,074$  micrômetros. Os resultados estão de acordo com trabalhos prévios

(TACHIBANA; NAKAMURA, 1965). Silva et al. (2017) obtiveram um tamanho médio de partículas de luteína encapsuladas com PVP pela técnica de dispersão sólida de aproximadamente 200 nm.

A Figura 8 apresenta os termogramas dos compostos poli(vinil pirrolidona) (PVP), betacaroteno (BC), mistura física na proporção de 10:1 (m:m) de PVP e BC, respectivamente (MF 10:1) e das nanopartículas de betacaroteno após a remoção do PVP. Os termogramas das misturas físicas nas proporções de 2:1, 5:1, 10:1 e 15:1 (m:m) de PVP e BC, respectivamente, estão apresentados na Figura 9. As misturas físicas foram preparadas com o objetivo de comparar com os termogramas das nanopartículas de betacaroteno. A Tabela 1 apresenta as entalpias e temperaturas de fusão do betacaroteno (BC), das nanopartículas de betacaroteno após a remoção do PVP (NP betacaroteno) e das misturas físicas de PVP e BC, respectivamente, nas proporções de 2:1, 5:1, 10:1 e 15:1 (m:m).

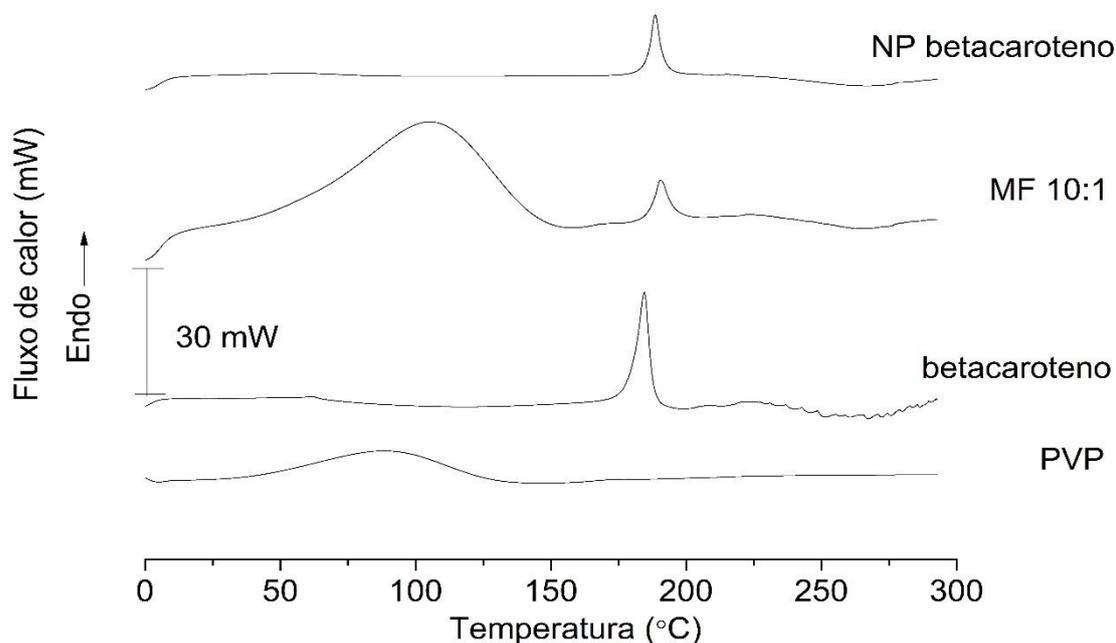


Figura 8 – Curvas de DSC do PVP, betacaroteno, mistura física entre PVP e betacaroteno na proporção 10:1 (MF 10:1) e das nanopartículas betacaroteno (NP betacaroteno)

Fonte: autoria própria.

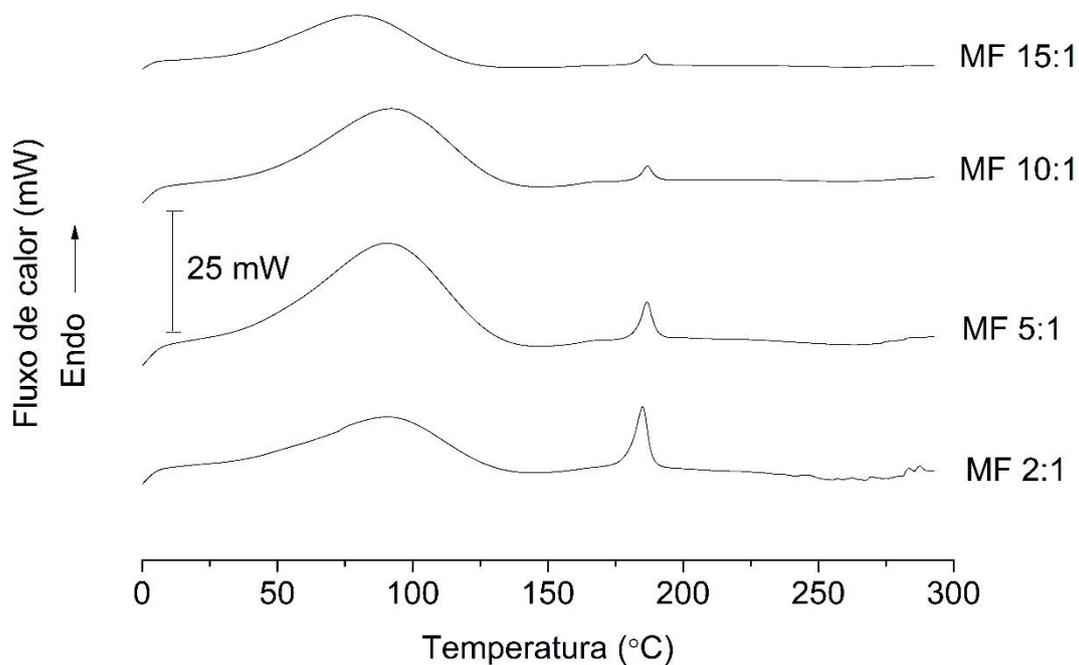


Figura 9 – Curvas de DSC das misturas físicas entre PVP e betacaroteno nas proporções de 2:1, 5:1, 10:1 e 15:1 (m:m).

Fonte: autoria própria.

Tabela 1 – Entalpias ( $\Delta H_f$ ) e temperaturas de fusão ( $T_f$ ) dos compostos.

Amostra	$T_f$ (°C)	$\Delta H_f$ real(J.g <sup>-1</sup> )
Betacaroteno	185	103,9
Nanopartículas de betacaroteno	189	159
Mistura física 2:1 (m:m) de PVP:BC	185	35,3
Mistura física 5:1 (m:m) de PVP:BC	187	10,6
Mistura física 10:1 (m:m) de PVP:BC	187	11,7
Mistura física 15:1 (m:m) de PVP:BC	186	4,5

Fonte: autoria própria.

Foi encontrada uma temperatura de fusão para o betacaroteno de 185°C. Yi et al. (2015) determinaram uma temperatura de fusão de 193°C para esse composto, utilizando gás nitrogênio com uma taxa de aquecimento 10°C.min<sup>-1</sup>, de 25 até 250°C.

O PVP não possui pico endotérmico por ser um polímero amorfo (JIANG; MO; YU, 2012), portanto, o pico próximo de 88°C na curva de DSC para onde esse composto está presente corresponde provavelmente à umidade residual do composto (SILVA et al., 2017). É possível observar que os picos dos compostos nos termogramas das misturas físicas são proporcionais às concentrações em massa utilizadas nas misturas físicas, como mostrado na Figura 9. É possível notar que a cristalinidade do betacaroteno não foi afetada após o processo de nanonização.

A Figura 10 apresenta os espectros de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) dos compostos do PVP, betacaroteno, mistura física na proporção 10:1 (MF 10:1) e das nanopartículas de betacaroteno. A Figura 11 apresenta os espectros de FTIR das misturas físicas de PVP e betacaroteno, respectivamente, nas proporções 2:1, 5:1, 10:1 e 15:1.

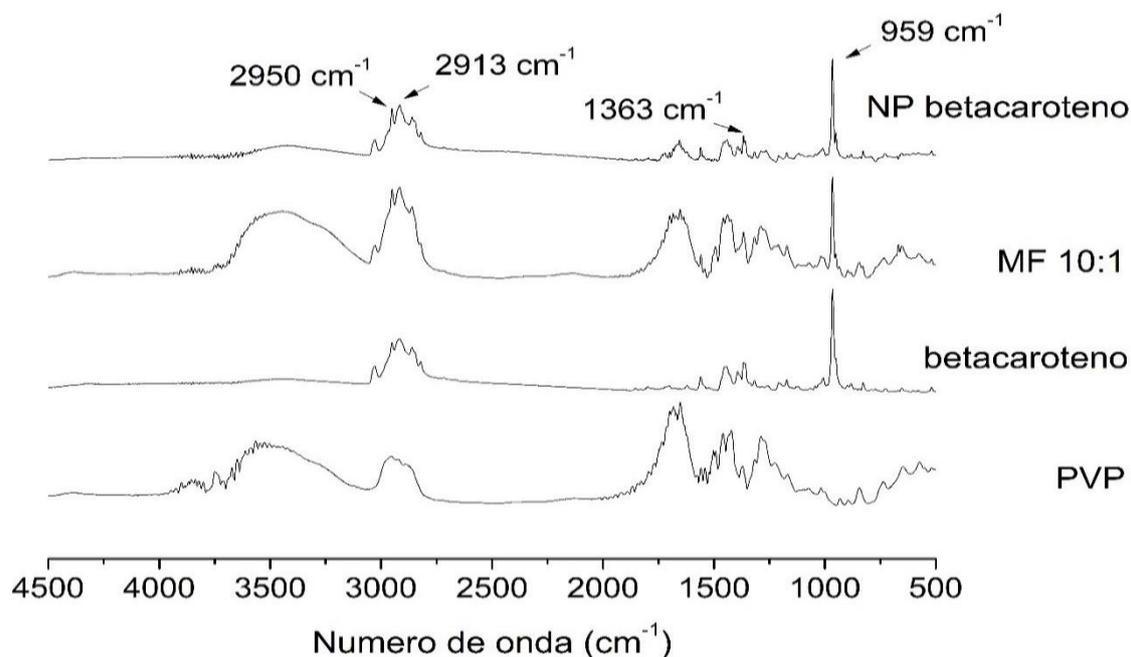


Figura 10 - Espectro de Infravermelho com Transformada de Fourier do PVP, betacaroteno (BC), mistura física na proporção 10:1 (MF 10:1), nanopartículas de betacaroteno (NP betacaroteno).

Fonte: autoria própria.

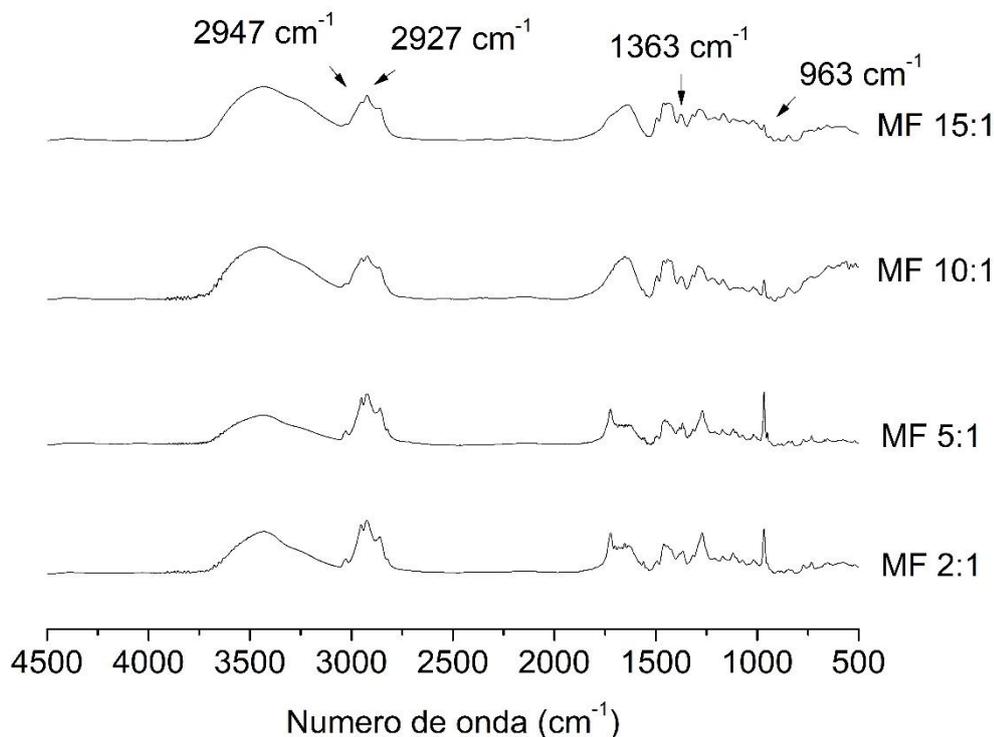


Figura 11 - Espectro de Infravermelho com Transformada de Fourier das misturas físicas entre PVP e betacaroteno nas proporções de 2:1, 5:1, 10:1 e 15:1 (m:m).

Fonte: autoria própria.

No espectro FTIR do betacaroteno, as bandas indicadas entre  $2950\text{ cm}^{-1}$  e  $2913\text{ cm}^{-1}$  são atribuídas aos alongamentos assimétricos e simétricos do  $\text{CH}_2$ , respectivamente. A banda representada no número de onda de  $959\text{-}963\text{ cm}^{-1}$  indica o alqueno conjugado. A banda em  $1363\text{ cm}^{-1}$  é característica dos anéis de  $\beta$ -ionona do betacaroteno (RUBIO-DIAZ et al., 2010). O espectro encontrado do betacaroteno é similar aos espectros obtidos por Rubio-Diaz et al. (2010), Yi et al. (2015) e Jain et al. (2016). Em relação às nanopartículas de betacaroteno, não foram encontradas alterações nos picos de absorção após a produção das nanopartículas, indicando que o processo de produção de nanopartículas não deve ter afetado a estrutura química do betacaroteno.

Para as misturas físicas, foram observados os picos característicos do betacaroteno e do PVP para todas as proporções analisadas, onde os picos são

atenuados proporcionalmente à massa utilizada na preparação das misturas físicas, conforme mostrado na Figura 11.

A Figura 12 apresenta os difratogramas obtidos para o PVP, betacaroteno, mistura física de PVP e BC na proporção de 10:1 (MF 10:1) e das nanopartículas de betacaroteno (NP betacaroteno).

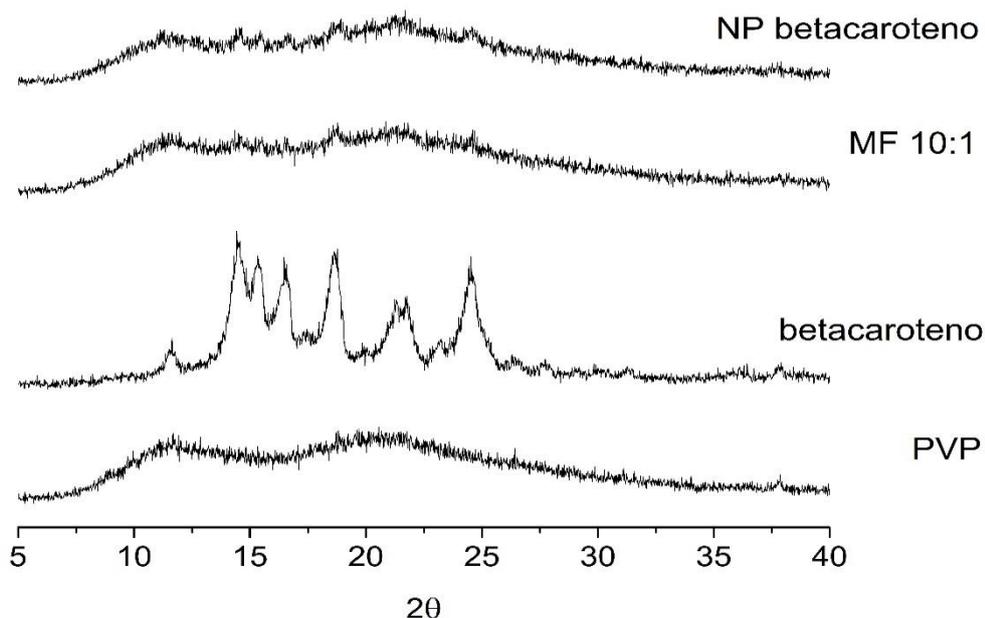


Figura 12 – Resultados de Difração de Raios-X do PVP, betacaroteno, mistura física na proporção 10:1 (MF 10:1), nanopartículas de betacaroteno (NP betacaroteno).

Fonte: autoria própria.

Os resultados da Difração de Raios-X mostram picos intensos entre 13 e 25°, indicando uma estrutura cristalina para o betacaroteno. A maior parte dos picos foi atenuado tanto na mistura física, quanto nas nanopartículas de betacaroteno, devido à baixa concentração de betacaroteno nesses compostos. Além disso, os difratogramas da mistura física e das nanopartículas não diferiram entre si, indicando que o betacaroteno em ambas as amostras permaneceu no mesmo estado cristalino.

## 5.2 Atividade enzimática

A Figura 13 apresenta a atividade da enzima glutathiona-S-transferase em relação às nanopartículas de betacaroteno, betacaroteno e PVP.

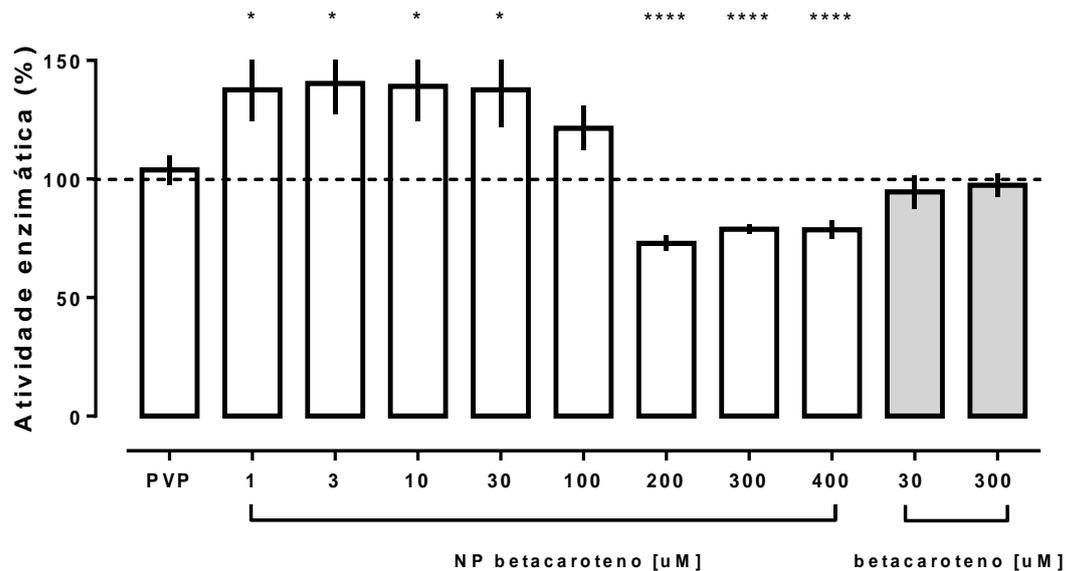


Figura 13 – Modulação da atividade da enzima glutathiona-S-transferase em meio aquoso pelas nanopartículas de betacaroteno, PVP e betacaroteno (\* $p < 0,05$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$  em relação ao respectivo controle).

Fonte: autoria própria.

Foi observado um aumento significativo da atividade da enzima glutathiona-S-transferase com as nanopartículas de betacaroteno ( $p < 0,05$ ) para as concentrações de 1, 3, 10 e 30  $\mu\text{M}$  e inibição para as concentrações finais de 200, 300 e 400  $\mu\text{M}$  ( $p < 0,0001$ ) nos ensaios *in vitro* em *Drosophila melanogaster*. O betacaroteno, por sua vez, não mostrou efeito na modulação na atividade enzimática da GST nas concentrações finais avaliadas de 30 e 300  $\mu\text{M}$ .

Dhingra e Bansal (2014) observaram um aumento significativo nos níveis de glutathiona reduzida em camundongos tratados com uma dose de betacaroteno via oral de 50 a 100  $\text{mg.kg}^{-1}$  por 21 dias em relação aos camundongos não tratados com o composto, assim como Novo et al. (2013), que também encontraram um aumento na relação entre glutathiona reduzida (GSH) e glutathiona oxidada (GSSG) em coração e fígado de ratos, com uma dosagem

diária via oral de  $500 \text{ mg.kg}^{-1}$  de betacaroteno até que os animais atingissem massa corporal de 200 a 250 g, o que corresponde a uma concentração final média de  $200 \mu\text{M}$  betacaroteno no corpo dos ratos.

Os resultados indicam que em altas concentrações, as nanopartículas de betacaroteno causaram uma diminuição significativa da atividade enzimática da glutathione-S-transferase. Trabalhos prévios indicam a capacidade do composto de atuar como antioxidante, neutralizando radicais livres (JANG; LIM; KIM, 2009; KIM; SEO; KIM, 2011). Yi et al. (2015) observaram aumento significativo da atividade antioxidante celular em nanopartículas de betacaroteno encapsuladas com caseinato de sódio, proteína isolada de soro e proteína isolada de soja com 1% em massa de betacaroteno, quando comparadas com o betacaroteno na forma convencional. O estudo *in vivo* realizado por McGill et al. (2003) avaliou a diminuição da atividade enzimática da enzima glutathione peroxidase em humanos tratados com uma dose de 30 mg diárias por 60 dias.

A Figura 14 apresenta a atividade da enzima acetilcolinesterase em relação às nanopartículas de betacaroteno, betacaroteno e PVP.

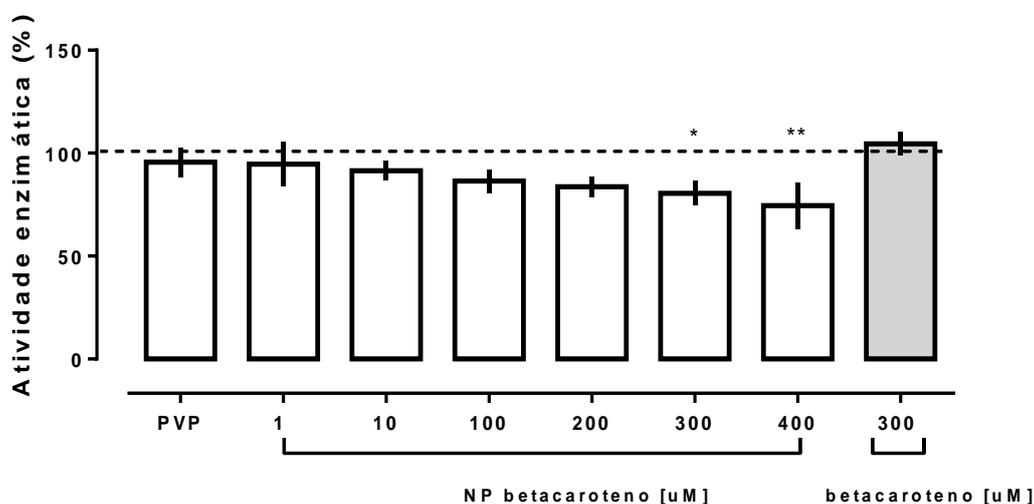


Figura 14 – Modulação da atividade da enzima acetilcolinesterase em meio aquoso pelas nanopartículas de betacaroteno, PVP e betacaroteno (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$  em relação ao respectivo controle).

Fonte: autoria própria.

Não foram encontrados dados na literatura sobre a interação entre o betacaroteno e a enzima acetilcolinesterase. Nos testes realizados, as nanopartículas de betacaroteno diminuíram significativamente a atividade da enzima acetilcolinesterase nas concentrações de 300 e 400  $\mu\text{M}$ . O betacaroteno não foi capaz de modular significativamente a atividade da enzima acetilcolinesterase na concentração de 300  $\mu\text{M}$ .

Lebda, El-Neweshy e El-Sayed (2012) observaram uma diminuição da atividade enzimática da acetilcolinesterase em estudo *in vivo* com ratos tratados diariamente com uma dose de 10  $\text{mg.kg}^{-1}$  de licopeno por 20 dias após exposição de altas doses de manganês (6  $\text{mg.kg}^{-1}$ ) por 4 semanas.

O comportamento das nanopartículas de betacaroteno em relação à modulação na atividade enzimática pode ser devido a uma maior área de superfície das nanopartículas, além da solubilidade em meio aquoso quando comparada com o betacaroteno na forma convencional (YI et al., 2015).

## 6. CONCLUSÕES

Foram obtidas nanopartículas de betacaroteno pela técnica de dispersão sólida utilizando poli(vinil pirrolidona) (PVP) como um estabilizante. Ainda foi possível observar que a estrutura do betacaroteno não foi alterada após o processo de nanonização e que não houve interação entre o PVP e o betacaroteno.

Em meio aquoso, as nanopartículas apresentaram uma maior atividade nos ensaios enzimáticos *in vitro*, o que indica uma considerável melhoria na performance do composto em meio aquoso. Assim, o processo de nanonização permitiu a manutenção da atividade biológica do betacaroteno na forma nanoparticulada..

Portanto, há um indicativo de que as nanopartículas de betacaroteno podem ser utilizadas no controle do sistema colinérgico, além de serem capazes de modular significativamente a atividade da enzima glutathione-S-transferase.

## 7. REFERÊNCIAS

AEBI, H. Oxygen Radicals in Biological Systems. **Methods in Enzymology**, v. 105, n. 1947, p. 121–126, 1984.

ADEDARA, I. A.; ABOLAJI, A. O.; ROCHA, J. B. T.; FAROMBI, E. O. Diphenyl Diselenide Protects Against Mortality, Locomotor Deficits and Oxidative Stress in *Drosophila melanogaster* Model of Manganese-Induced Neurotoxicity. **Neurochemical Research**, v. 41, n. 6, p. 1430–1438, 2016.

AKINYEMI, A. J.; OBOH, G.; OGUNSUYI, O.; ABOLAJI, A. O.; UDOFIA, A. Curcumin-supplemented diets improve antioxidant enzymes and alter acetylcholinesterase genes expression level in *Drosophila melanogaster* model. **Metabolic Brain Disease**, p. 1–7, 2017.

ARAÚJO, C. R. M.; SANTOS, V. L. A.; GONSALVES, A. A. Acetilcolinesterase - AChE: Uma Enzima de Interesse Farmacológico. **Revista Virtual de Química**, v. 8, n. 6, p. 1818–1834, 2016.

ARAUJO, S. M.; PAULA, M. T.; POETINI, M. R.; MEICHTRY, M.; BORTOLOTO, V. C.; ZARZECKI, M. S.; JESSE, C. R.; PRIGOL, M. Effectiveness of gamma-oryzanol in reducing neuromotor deficits, dopamine depletion and oxidative stress in a *Drosophila melanogaster* model of Parkinson's disease induced by rotenone. **NeuroToxicology**, v. 51, p. 96–105, 2015.

BASTOS, D. H. M.; ROGERO, M. M.; ARÊAS, J. A. G. Mecanismos de ação de compostos bioativos dos alimentos no contexto de processos inflamatórios relacionados à obesidade. **Arq Bras Endocrinol Metab.**, v. 53/5, p. 646-656, 2009.

BENDICH, A. Functions and actions of retinoids and carotenoids: building on the vision on James Allen Olson. Proceedings of a symposium to honor the memory of James Allen Olson. **The Journal of nutrition**, v. 134, n. 1, p. 220S–293S, 2004.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1–2, p. 248–254, 1976.

BURRI, B. J. Beta-carotene and human health: A review of current research. **Nutrition Research**, v. 17, n. 3, p. 547–580, 1997.

CHIOU, W. I. N. L.; RIEGELMAN, S. Preparation and Dissolution Characteristics of Several Fast-Release Solid Dispersions of Griseofulvin. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 58, n. 12, p. 1505–1510, 1969.

CSEPANYI, E.; CZOMPA, A.; HAINES, D.; LEKLI, I.; BAKONDI, E.; BALLA, G.; TOSAKI, A.; BAK, I. Cardiovascular effects of low versus high-dose beta-carotene in a rat model. **Pharmacological Research**, v. 100, p. 148–156, 2015.

DAIMIEL, L.; VARGAS, T.; RAMÍREZ DE MOLINA, A. Nutritional genomics for the characterization of the effect of bioactive molecules in lipid metabolism and related pathways. **Electrophoresis**, v. 33, n. 15, p. 2266–2289, 2012.

DARVESH, S.; WALSH, R.; KUMAR, R.; CAINES A.; ROBERTS, S.; MAGEE, D.; ROCKWOOD, K.; MARTIN, E. Inhibition of human cholinesterases by drugs used to treat Alzheimer disease. **Alzheimer Disease and Associated Disorder**, v. 17, n. 2, p. 117–126, 2003.

DHINGRA, D.; BANSAL, Y. Antidepressant-like activity of beta-carotene in unstressed and chronic unpredictable mild stressed mice. **Journal of Functional Foods**, v. 7, n. 1, p. 425–434, 2014.

DORAN, M. L.; KNEE, J. M.; WANG, N.; RZEZCNICZAK, T. Z.; PARKES, T. L.; LI, L.; MERRITT, T. J. S. Metabolomic analysis of oxidative stress: Superoxide dismutase mutation and paraquat induced stress in *Drosophila melanogaster*. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 113, n. August, p. 323–334, 2017.

ELLMAN, G. L. Tissue Sulfhydryl Groups. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 82, p. 70–77, 1959.

GUL, K.; TAK, A.; SINGH, A. K.; SINGH, P.; YOUSUF, B.; WANI, A. A. Chemistry, encapsulation, and health benefits of  $\beta$ -carotene - A review. **Cogent Food & Agriculture**, v. 1, n. 1, p. 1–12, 2015.

GUPTA, B. S.; CHEN, B.; LEE, M. Solvation consequences of polymer PVP with biological buffers MES, MOPS and MOPSO in aqueous solutions. **The Journal Of Chemical Thermodynamics**, v. 91, p. 62–72, 2015.

HABIG, W. H., PABST. M. J., JAKOBY, W. B. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 249, n. 22, p. 7130–7139, 1974.

HARRISON, E. H. Mechanisms involved in the intestinal absorption of dietary vitamin A and provitamin A carotenoids. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1821, p. 70-77, 2012.

HUBER, P. C.; ALMEIDA, W. P.; DE FÁTIMA, A. Glutathione e enzimas relacionadas: Papel biológico e importância em processos patológicos. **Química Nova**, v. 31, n. 5, p. 1170–1179, 2008.

HOSAMANI, R.; MURALIDHARA. Acute exposure of drosophila melanogaster to paraquat causes oxidative stress and mitochondrial dysfunction. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v. 83, n. 1, p. 25–40, 2013.

JAIN, A; THAKUR, D.; GHOSHAL, G.; KATARE, O. P.; SHIVHARE, U.S. Characterization of microcapsulated  $\beta$ -carotene formed by complex coacervation using casein and gum tragacanth. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 87, p. 101–113, 2016.

JANG, S. H.; LIM, J. W.; KIM, H. Beta-carotene inhibits Helicobacter pylori-induced expression of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 in human gastric epithelial AGS cells. **Journal of physiology and pharmacology : an official journal of the Polish Physiological Society**, v. 60 Suppl 7, p. 131–137, 2009.

JIANG, Y. N.; MO, H. Y.; YU, D. G. Electrospun drug-loaded core-sheath PVP/zein nanofibers for biphasic drug release. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 438, n. 1–2, p. 232–239, 2012.

KALIORA, A. C.; DEDOUSSIS, G. V. Z.; SCHMIDT, H. Dietary antioxidants in preventing atherogenesis. **Atherosclerosis**, v. 187, n. 1, p. 1–17, 2006.

KARAMESE, S. A.; TOKTAY, E.; UNAL, D.; SELLI, J.; KARAMESE, M.; MALKOC, I. The protective effects of beta-carotene against ischemia/reperfusion injury in rat ovarian tissue. **Acta Histochemica**, v. 117, n. 8, p. 790–797, 2015.

KASPERCZYK, S.; DOBRAKOWSKI, M.; KASPERCZYK, J.; OSTALOWSKA, A.; ZALEJSKA-FIOLKA, J.; BIRKNER, E. Beta-carotene reduces oxidative stress, improves glutathione metabolism and modifies antioxidant defense systems in lead-exposed workers. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 280, n. 1, p. 36–41, 2014.

KAULMANN, A.; BOHN, T. Carotenoids, inflammation and oxidative stress – implications of cellular signaling pathways and relation to chronic disease prevention. **Nutrition Research**, v. 34, n. 11, p. 907–929, 2014.

KIM, Y.; SEO, J. H.; KIM, H.  $\beta$ -Carotene and lutein inhibit hydrogen peroxide-induced activation of NF- $\kappa$ B and IL-8 expression in gastric epithelial AGS cells. **Journal of nutritional science and vitaminology**, v. 57, n. 3, p. 216–23, 2011.

KIM, J.; SEO, T.; LIM, S. Preparation of aqueous dispersion of beta-carotene nano-composites through complex formation with starch dextrin. **Food Hydrocolloids**, v. 33(2), p. 256–263, 2013.

KOHNO, Y.; KATO, Y.; SHIBATA, M.; FUKUHARA, C.; MAEDA, Y.; TOMITA, Y.; KOBAYASHI, K. Fixation and stability enhancement of beta-carotene by organo-modified mesoporous silica. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 220, p. 1–6, 2016.

KOSTYUK, V. A.; POTAPOVICH, A. I. Superoxide-driven oxidation of quercetin and a simple sensitive assay for determination of superoxide dismutase. **Biochemistry International**, v. 19, n. 5, p. 1117–1124, 1989.

KRINSKY, N. I. Carotenoids as antioxidants. **Nutrition**, v. 17, n. 10, p. 815–817, 2001.

LEBDA, M. A.; EL-NEWESHY, M. S.; EL-SAYED, Y. S. Neurohepatic toxicity of subacute manganese chloride exposure and potential chemoprotective effects of lycopene. **NeuroToxicology**, v. 33, n. 1, p. 98–104, 2012.

MARSANASCO, M.; MÁRQUEZ, A. L.; WAGNER, J. R.; CHIARAMONI, N. S.; ALONSO, S. V. Bioactive compounds as functional food ingredients: Characterization in model system and sensory evaluation in chocolate milk. **Journal of Food Engineering**, v. 166, p. 55–63, 2015.

MATTEA, F.; MARTÍN, Á.; COCERO, M. J. Carotenoid processing with supercritical fluids. **Journal of Food Engineering**, v. 93, n. 3, p. 255–265, 2009.

MCGILL, C. R.; GREEN, N. R.; MEADOWS, M. C.; GROPPER, S. S. Beta-carotene supplementation decreases leukocyte superoxide dismutase activity and serum glutathione peroxidase concentration in humans. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 14, n. 11, p. 656–662, 2003.

NOVO, R. et al. Effect of Beta-Carotene on Oxidative Stress and Expression of Cardiac Connexin 43. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, p. 233–239, 2013.

NWACHUKWU, I. D.; UDENIGWE, C. C.; ALUKO, R. E. Lutein and zeaxanthin: Production technology, bioavailability, mechanisms of action, visual function, and health claim status. **Trends in Food Science & Technology**, v. 49, p. 74–84, 2016.

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

RAUCH, N.; NAUEN, R. Characterization and molecular cloning of a glutathione S-transferase from the whitefly *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae). **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 34, n. 4, p. 321–329, 2004.

REIN, M. J.; RENOUF, M.; CRUZ-HERNANDEZ, C.; ACTIS-GORETTA, L.; THAKKAR, S. K.; PINTO, M. S. Bioavailability of bioactive food compounds: a challenging journey to bioefficacy. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 75, n. 3, p. 588-602, 2013.

REKSAMUNANDAR, R. P.; EDIKRESNHA, E.; MUNIR, M. M.; DAMAYANTI, S.; KHAIRURRIJAL. Encapsulation of  $\beta$ -carotene in poly(vinylpyrrolidone) (PVP) by Electrospinning Technique. **Procedia Engineering**, v. 170, p. 19–23, 2017.

RIBEIRO, E. P., SERAVALLI, E. A. G. Química de alimentos. São Paulo: Edgard Blücher, Instituto Mauá de Tecnologia, p. 184, 2004.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Carotenoids and food preparation: the retention of provitamin A carotenoids in prepared, processed and stored foods. **Contract**, n. January, p. 1–93, 1997.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Quantitative analysis, in vitro assessment of bioavailability and antioxidant activity of food carotenoids - A review. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 23, n. 7, p. 726–740, 2010.

RUBIO-DIAZ, D. E.; NARDO, T.; SANTOS, A.; JESUS, S.; FRANCIS, D.; RODRIGUEZ-SAONA, L. E. Profiling of nutritionally important carotenoids from genetically-diverse tomatoes by infrared spectroscopy. **Food Chemistry**, v. 120, n. 1, p. 282–289, 2015.

RUTKOWSKI, M.; GRZEGORCZYK, K. Adverse effects of antioxidative vitamins. **International Journal of Occupational Medicine and Environmental Health**, v. 25, n. 2, p. 105–121, 2012.

SAINI, R. K.; NILE, S. H.; PARK, S. W. Carotenoids from fruits and vegetables: Chemistry, analysis, occurrence, bioavailability and biological activities. **Food Research International**, v. 76, p. 735–750, 2015.

SALVIA-TRUJILLO, L.; QIAN, C.; MARTÍN-BELLOSO, O.; MCCLEMENTS, D. J. Influence of particle size on lipid digestion and  $\beta$ -carotene bioaccessibility in emulsions and nanoemulsions. **Food Chemistry**, v. 141, n. 2, p. 1475–1480, 2013.

SANT'ANNA, V.; GURAK, P.D.; MARCZAK, L. D. F.; TESSARO, I. S. Tracking bioactive compounds with colour changes in foods - A review. **Dyes and Pigments**, v. 98, n. 3, p. 601–608, 2013.

SAREEN, S.; JOSEPH, L.; MATHEW, G. Improvement in solubility of poor water-soluble drugs by solid dispersion. **International Journal of Pharmaceutical Investigation**, v. 2, n. 1, p. 12, 2012.

SHAMI, N. J. I. E.; MOREIRA, E. A. M. Lycopene as an antioxidant agent. **Revista de Nutrição**, v. 17, n. 2, p. 227–236, 2004.

SILVA, J. T. P.; GEISS, J. M. T.; OLIVEIRA, S. M.; BRUM, E. S.; SAGAE, S. C.; BECKER, D.; LEIMANN, F. V.; INEU, R. P.; GUERRA, G. P.; GONÇALVES, O. H. Nanoencapsulation of lutein and its effect on mice's declarative memory. **Materials Science and Engineering C**, v. 76, p. 1005–1011, 2017.

STAHL, W.; SIES, H. Antioxidant activity of carotenoids. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 24, n. 6, p. 345–351, 2003.

TACHIBANA, T.; NAKAMURA, A. A Methode for Preparing an Aquous Colloidal Dispersion of Organic Materials by Using Water-Soluble Polymers: Dispersion of  $\beta$ -carotene by Polyvinylpirrolidone. **Kolloid-Zeitschrift und Zeitschrift für Polymere**, v. 203, n. 2, p. 130-133, 1965.

TANG, G. Bioconversion of dietary provitamin A carotenoids to vitamin A in humans. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 91, n. 5, p. 1468–1473, 2010.

TORRES, M. C. L.; SOARES, N. F. F.; MAIA, J. F. Parâmetros cinéticos da Glutathione S-Transferase e sua ativação por extratos de vegetais. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 24, n. 2, p. 243–248, 2004.

VALKO, M.; LEIBFRITZ, D.; MONCOL, J.; CRONIN, M. T. D.; MAZUR, M.; TELSER, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 39, n. 1, p. 44–84, 2007.

VINUTHA, B.; PRASHANTH, D.; SALMA, K.; SREEJA, S. L.; PRATITI, D.; PADMAJA, R.; RADHIKA, S.; AMIT, A.; VENKATESHWARLU, K.; DEEPAK, M. Screening of selected Indian medicinal plants for acetylcholinesterase inhibitory activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 109, n. 2, p. 359–363, 2007.

YI, J.; LAM, T. I.; YOKOYAMA, W.; CHENG, L. W.; ZHONG, F. Beta-carotene encapsulated in food protein nanoparticles reduces peroxy radical oxidation in Caco-2 cells. **Food Hydrocolloids**, v. 43, p. 31–40, 2015.