

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

JANMILLE MONTEIRO MARCELO

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DE DISPERSÕES SÓLIDAS CONTENDO  
BERBERINA UTILIZANDO *Drosophila melanogaster***

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

CAMPO MOURÃO

2022

JANMILLE MONTEIRO MARCELO

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DE DISPERSÕES SÓLIDAS CONTENDO  
BERBERINA UTILIZANDO *Drosophila melanogaster***

**EVALUATION OF THE TOXICITY OF SOLID DISPERSIONS CONTAINING BERBERINE  
USING *Drosophila melanogaster***

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

Orientador: Prof. Dr. Rafael Porto Ineu

Coorientador: Prof. Dr. Odinei Hess Gonçalves

CAMPO MOURÃO

2022



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

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



JANMILLE MONTEIRO MARCELO

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DE DISPERSÕES SÓLIDAS CONTENDO  
BERBERINA UTILIZANDO *Drosophila melanogaster***

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

Data de aprovação: 15 de dezembro de 2021.

Prof. Rafael Porto Ineu - Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Prof.a Ana Paula Peron - Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Prof. Dr. Rilton Alves de Freitas - Universidade Federal do Paraná (UFPR)

## DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à Deus, aos meus pais Geni Monteiro e Geraldo Marcelo, ao meu irmão Marcelinho, à toda minha família e amigos.

## AGRADECIMENTOS

Nesse momento a palavra que vem em mente não poderia ser outra a não ser: GRATIDÃO!

Gratidão a Deus por tudo, pela força nas horas mais difíceis, por não ter me deixado desistir em momento algum. Por me fazer ser uma pessoa melhor a cada dia e ter me guiado para a realização de mais um sonho.

Aos meus pais, Geni Monteiro e Geraldo Marcelo pelo imenso amor e dedicação a mim a todo instante, pela criação e exemplo de honestidade. Se eu sempre fui essa pessoa estudiosa foi graças ao exemplo que tenho dentro de casa, de pessoas formadas, inteligentes e que sempre correram atrás do melhor. Sem vocês não estaria aqui hoje podendo olhar para trás e ver que tudo está valendo a pena. Obrigada mãe por sempre me colocar em suas orações.

Ao meu irmão Marcelinho (*in memorian*), que não conheci, mas que é incrível te sentir dentro de mim, me dando força para seguir a diante na conquista dos meus objetivos e sonhos. E como falar de você sem me emocionar?! Agradeço meu irmão por morar em meu coração.

Aos meus avós paternos, Geraldo Marcelo (*in memorian*) e Ludovina de Jesus Marcelo (*in memorian*) por me transmitirem sua imensa luz na terra e no céu e por me deixarem a herança do amor infinito, torcer pelo Clube de Regatas Vasco da Gama (péssima herança ein!).

Ao meu avô materno Amarilho da Silva (*in memorian*) pelo carinho e por sempre ter lutado pela família dando apoio a todos que quiseram estudar, orgulho imenso de uma família de Advogados, Engenheiros, Marinheiros, Policiais, Professores, dentre tantas outras profissões espalhadas. À minha avó materna Geralda Monteiro por tudo, simplesmente a melhor vó de todas, quem dera eu crescer como a senhora com tanto amor para dar, garra e vontade de viver.

Aos meus padrinhos João (*in memorian*) e Iracema (*in memorian*) por cuidarem de mim desde os primeiros dias de nascida enquanto meus pais trabalhavam. Obrigada por tanto amor e carinho de filha que sempre tiveram

comigo. Tia Jane você se foi e eu estava aqui em CM, não pude me despedir...obrigada por todas as risadas e carinho comigo. Amo vocês!

Às minhas famílias Monteiro's e Marcelo's pelo carinho e apoio em todos os momentos. Pela paciência e respeito comigo por todas as festas que não pude comparecer por estar estudando.

Aos meus amigos e colegas da vida e da Universidade que conheci em Campo Mourão, Juliana, Mari, Bruno, Joy, Fábio, Manaus, Pablo, Day, Talita, Vitória, por todo carinho e por tornarem essa caminhada muito mais fácil e menos árdua. Gratidão à toda galera que passou pelo Lab C005 pela ajuda e disposição para cuidar das mosquinhas e a Paty por toda ajuda e carinho, em especial. Obrigada a todos por cada gesto de carinho por mim, por todas as bagunças e risos constantes. Daniela, o que seria de mim sem você? eu agradeço muito a Deus por ter me presenteado com seu amor, carinho e amizade por toda a vida...eu te amo!

Aos meus amigos de Volta Redonda-RJ que mesmo longe se fazem presentes, obrigada sempre por ter vocês em minha vida, Joyce, Fill, Stella, Jaime, Gabriel, Deyse, Amanda, às meninas do futsal e do basquete que sentirão minha falta nas peladas haha.

A todos os professores que me passaram seus conhecimentos. Sem vocês seria impossível conquistar mais uma etapa da minha vida com todo sucesso. Em especial agradeço ao Professor Rafael por me orientar neste projeto e ao Professor Odinei por me coorientar.

A todos que de alguma forma me ajudaram a subir mais um degrau dos meus objetivos, sonhos, com todo meu amor e carinho os meus sinceros agradecimentos: Muito Obrigada!

À Universidade Tecnológica Federal do Paraná por fornecer-me toda estrutura necessária para implantação deste trabalho, a CENTRAL ANALÍTICA MULTIUSUÁRIO DA UTFPR CAMPO MOURÃO (CAMulti-CM) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001 pela bolsa concedida.

## EPÍGRAFE

*"Se você olhar para todo o universo da ciência, você verá uma grande área escura, e se olhar mais perto verá alguns pontos bem iluminados aqui e acolá, e em cada um há pesquisadores discutindo entre si, mas eles não olham para fora dessas janelas para imaginar o que possa estar lá. Quaisquer que sejam as respostas, elas provavelmente serão descobertas estudando as boas e velhas moscas da fruta".*

Peter Lawrence

*"Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades, lembrai-vos de que as grandes coisas do homem foram conquistadas do que parecia impossível".*

Charles Chaplin

## RESUMO

A berberina é um composto bioativo, especificamente um alcaloide isoquinolina do tipo protoberberina presente em plantas pertencentes à família da Berberidaceae. Ela possui características já conhecidas como atividade antioxidante, anti-inflamatória e neuroprotetora. Contudo, apresenta baixa biodisponibilidade oral, baixa solubilidade em água e instabilidade química, o que limita sua aplicação dificultando sua inserção na maioria dos alimentos. A nanotecnologia representa um grande avanço para a indústria de alimentos nas últimas décadas e vem sendo aplicada pelas indústrias visando à elaboração de novos produtos, além de contornar limitações relevantes da maioria dos compostos bioativos. No entanto, é importante determinar a toxicidade desses compostos nanoencapsulados a fim de garantir a segurança alimentar dos consumidores. Várias espécies estão sendo utilizadas como organismo modelo para estudos *in vivo* em toxicologia, inclusive a *Drosophila melanogaster* (*Dm*), também conhecida como mosca da fruta. O objetivo desse estudo foi verificar a toxicidade da dispersão sólida contendo berberina utilizando a *Drosophila melanogaster* como modelo biológico alternativo. A produção das partículas foi realizada pela técnica de dispersão sólida. A taxa de sobrevivência das moscas foi avaliada diariamente durante os 5 dias de tratamento, momento em que o tecido das moscas foi homogeneizado e testado *ex vivo* quanto à atividade das enzimas colinérgicas acetilcolinesterase (AChE) e butirilcolinesterase (BChE), bem como das enzimas antioxidantes catalase (CAT), a superóxido dismutase (SOD) e a glutatona (GSH). As técnicas de caracterização mostraram que a produção da dispersão sólida contendo berberina foi eficiente. A dispersão sólida contendo berberina não levou à alteração da taxa de mortalidade significativa nas doses (3; 10 e 30  $\mu\text{M}$ ) avaliadas em relação ao controle. A berberina desempenhou papel neuroprotetor e antioxidante mantendo as enzimas colinérgicas e as enzimas antioxidantes em equilíbrio celular.

Palavras-chave: nanotecnologia; enzimas colinérgicas; antioxidante; compostos bioativos.



## ABSTRACT

Berberine is a bioactive compound, specifically an isoquinoline alkaloid of the protoberberine type present in plants belonging to the Berberidaceae family. It presents known antioxidant, anti-inflammatory and neuroprotective activity. However, it has low oral bioavailability, low water solubility and chemical instability, which limits its application in foodstuff. Nanotechnology represents a great advance for the food industry in recent decades and has been applied by industries aiming at the development of new products, in addition to overcome limitations of bioactive compounds. However, it is important to determine the toxicity of these nanoencapsulated compounds in order to ensure food safety. Several species are being used as model organisms for *in vivo* toxicology studies, including *Drosophila melanogaster* (*Dm*), also known as the fruit fly. The aim of this study was to verify the toxicity of berberine-containing nanoparticles using *Drosophila melanogaster* as an alternative biological model. The production of particles was carried out using the solid dispersion technique. The survival rate of the flies was evaluated daily during the 5 days of treatment, at which time the tissue of the flies was homogenized and tested in an *ex vivo* model for the activities of the cholinergic enzymes acetylcholinesterase (AChE) and butyrylcholinesterase (BChE), as well as the antioxidant enzymes (catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD) and glutathione (GSH)). The characterization techniques showed that the production of solid dispersion containing berberine was efficient. The solid dispersion containing berberine did not change the mortality rate significantly in the doses (3, 10 and 30  $\mu\text{M}$ ) evaluated in relation to the control. Berberine played a neuroprotective and antioxidant role, keeping cholinergic enzymes and antioxidant enzymes in cellular balance.

Keywords: nanotechnology; cholinergic enzymes; antioxidants; bioactive compounds.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> – Estrutura química da berberina. ....	18
<b>Figura 2</b> – Fonte de berberina <i>Berberis vulgaris</i> .....	19
<b>Figura 3</b> – Representação das nanocápsulas (a) e nanoesferas (b). ....	20
<b>Figura 4</b> – Estrutura química do copolímero P407. ....	22
<b>Figura 5</b> – Diferenças no tamanho e abdômen de <i>Drosophila melanogaster</i> fêmea (a) e macho (b). ....	23
<b>Figura 6</b> – Estágios de desenvolvimento da <i>Drosophila</i> : embrião, larva (primeiro ínstar, segundo ínstar e terceiro ínstar), pupa e adulto. ....	24
<b>Figura 7</b> – Micrografias das nanopartículas contendo berberina obtidas por TEM.....	35
<b>Figura 8</b> – Dispersão aquosa (a) de nanopartículas contendo berberina; (b) de berberina; e (c) berberina solubilizada em etanol (todas na concentração de 1 mg/mL) ..... .....	35
<b>Figura 9</b> – Termogramas obtidos por Calorimetria Diferencial de Varredura de berberina, NPs-berberina, P407 e mistura física.....	36
<b>Figura 10</b> – Espectros na região de Infravermelho de berberina, P407, NPs-berberina e mistura física. Transmitância (a) e Absorbância (b).....	37
<b>Figura 11</b> – Espectros de absorção na região do UV-Vis de berberina, NPs-berberina e P407.....	39
<b>Figura 12</b> – Taxas de sobrevivência de moscas suplementadas com: (a) NPs-berberina, (b) Berberina livre em água e (c) Berberina livre em etanol. Os dados foram coletados a cada 24 horas para cada grupo durante 5 dias. O número de moscas sobreviventes é representado como % de controle. O número total de moscas (500 por grupo) representa a soma de cinco experimentos independentes (**p<0,01). Os valores são expressos como média ± SEM.....	40
<b>Figura 13</b> – (a) Efeitos das NPs-berberina e da berberina livre em água na atividade da AChE e (b) Efeitos das NPs-berberina e da berberina livre em etanol na atividade da AChE no tecido de <i>Drosophila melanogaster</i> . Os valores foram expressos em média ± SEM (n = 5 por grupo). Não houve significância detectada pela Análise de Variância Unidirecional (ANOVA) seguida do teste de Tukey em comparação ao controle. ....	43

**Figura 14** – (a) Efeitos das NPs-berberina e da berberina livre em água na atividade da BChE e (b) Efeitos das NPs-berberina e da berberina livre em etanol na atividade da BChE no tecido de *Drosophila melanogaster*. Os valores foram expressos em média  $\pm$  SEM (n = 5 por grupo). Não houve significância detectada pela Análise de Variância Unidirecional (ANOVA) seguida do teste de Tukey em comparação ao controle. ....44

**Figura 15** – (a) Efeitos das NPs-berberina e da berberina livre em água na atividade de tióis totais. (b) Efeitos das NPs-berberina e da berberina livre em etanol na atividade de tióis totais. Os valores foram expressos em média  $\pm$  SEM (n = 5 por grupo). A significância foi determinada pela Análise de Variância Unidirecional (ANOVA) seguida do teste de Tukey (\*\*p<0,01) em comparação ao controle. ....46

**Figura 16** – Os gráficos acima representam a atividade da catalase. (a) NPs-berberina e berberina livre em água; e (b) NPs-berberina e berberina em etanol. Os resultados são mostrados como média  $\pm$  SEM de 5 experimentos independentes. ....47

**Figura 17** – Os gráficos acima representam a inibição induzida da auto-oxidação da quercetina em 50% na atividade da SOD. (a) NPs-berberina e berberina livre em água; e (b) NPs-berberina e berberina em etanol. Os resultados são mostrados como média  $\pm$  SEM de 5 experimentos independentes e \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001 e \*\*\*\*p<0,0001 denotam diferença significativa em comparação com a porcentagem de inibição. ...48

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACh	Acetilcolina
AChE	Acetilcolinesterase
AChEIs	Inibidores da AChE
ASCh	Acetiltiocolina
BBR	Berberina
BCh	Butirilcolina
BChE	Butirilcolinesterase
BSCh	Butiriltiocolina
ChE	Colinesterases
ChIs	Inibidores da Colinesterase
DA	Doença de Alzheimer
<i>Dm</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>
DP	Doença de Parkinson
DSC	Calorimetria Diferencial de Varredura
DTNB	5,5'-Dithiobis (ácido 2-nitrobenzóico)
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
FDA	Food and Drug Administration
FTIR	Espectrofotometria no Infravermelho com Transformada de Fourier
NPs-berberina	Nanopartículas contendo berberina
P407	Poloxamer 407
PEO	Poli (óxido etileno)
PPO	Poli (óxido propileno)
TEM	Microscopia Eletrônica de Transmissão
UV-Vis	Espectroscopia de Absorção na Região do Ultravioleta-Visível

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	14
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	17
<b>2.1 Objetivo Geral</b> .....	17
<b>2.2 Objetivos Específicos</b> .....	17
<b>3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	18
<b>3.1 Berberina</b> .....	18
<b>3.2 Nanotecnologia: Nanoencapsulação e Nanotoxicidade</b> .....	19
3.2.1 Técnicas de Nanoencapsulação .....	21
<b>3.3 <i>Drosophila melanogaster</i></b> .....	23
<b>3.4 Atividade Enzimática</b> .....	25
<b>3.5 Enzimas Antioxidantes</b> .....	26
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	29
<b>4.1 Material</b> .....	29
<b>4.2 Produção das Nanopartículas de Berberina</b> .....	29
<b>4.3 Caracterização das Nanopartículas</b> .....	30
<b>4.4 Análises Biológicas</b> .....	31
4.4.1 Ensaio <i>in vivo</i> .....	31
4.4.1.1 Teste de sobrevivência .....	31
4.4.2 Ensaios <i>ex vivo</i> .....	32
4.4.2.1 Preparação do homogeneizado .....	32
4.4.2.2 Atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE, EC 3.1.1.7) .....	32
4.4.2.3 Atividade da enzima butirilcolinesterase (BChE, EC 3.1.1.8) .....	33
4.4.2.4 Determinação de tióis totais .....	33
4.4.2.5 Atividade da enzima catalase (CAT) .....	33

4.4.2.6 Determinação da atividade da enzima superóxido dismutase (SOD).....	34
4.4.3 Análises Estatísticas .....	34
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>35</b>
<b>5.1 Caracterização das Nanopartículas .....</b>	<b>35</b>
<b>5.2 Efeito da berberina na Taxa de Sobrevivência das <i>Drosophila melanogaster</i> .....</b>	<b>39</b>
<b>5.3 Ensaio <i>ex vivo</i> em <i>Drosophila melanogaster</i>.....</b>	<b>42</b>
5.3.1 Determinação das atividades da AChE e BChE .....	42
5.3.2 Determinação da atividade de Tióis Totais .....	46
5.3.3 Determinação das atividades das enzimas antioxidantes CAT e SOD .....	47
<b>6 CONCLUSÃO .....</b>	<b>51</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>52</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A berberina (BBR) é um alcaloide isoquinolina do tipo protoberberina natural produzido por diversas espécies de plantas medicinais, principalmente do gênero *Berberis*, comumente encontradas no oriente (AHMED et al., 2015; LIU et al., 2016; SAHIBZADA et al., 2018). Uma série de estudos relatam que a BBR possui inúmeros benefícios farmacológicos, inclusive para tratamentos contra o câncer, hepatite, estomatite e diarreia. Além disso, apresenta efeitos como antioxidante, antimicrobiano, antiprotozoário e anti-inflamatório (LIU et al., 2016; SAHIBZADA et al., 2018; SAHIBZADA et al., 2020).

No entanto, a berberina é um composto bioativo que apresenta baixa biodisponibilidade oral (abaixo de 1%) e baixa solubilidade em água, o que dificulta a taxa de dissolução e seu uso clínico, levantando assim a importância da discussão de estratégias para melhorar suas limitações (LIU et al., 2016; SAHIBZADA et al., 2018).

A nanotecnologia na indústria alimentícia se tornou um dos avanços tecnológicos mais promissores para atualizar a ciência dos alimentos nas últimas décadas (HE; HWANG, 2016; KHORASANI; DANAEI; MOZAFARI, 2018). Sendo cada vez mais utilizada nas áreas alimentícia e farmacêutica, a nanotecnologia se refere ao uso de nanomateriais cujas estruturas variam de 1 a 100 na escala nanométrica (BAJPAI et al., 2018).

Uma das aplicações práticas da nanotecnologia é a nanoencapsulação de compostos bioativos sob o formato de nanopartículas. A nanoencapsulação consiste em uma técnica de grande eficiência nas indústrias capaz de solucionar algumas limitações dos compostos fitoquímicos, como melhorar a baixa biodisponibilidade oral, aumentar a estabilidade térmica e oxidativa, controlar sua taxa de liberação, além de conseguir mitigar ou manter o aroma e o sabor dos produtos, a fim de aumentar a chance de sua aplicação em sistemas alimentares (KHORASANI; DANAEI; MOZAFARI, 2018; BAZANA; CODEVILLA; MENEZES, 2019).

Os processos responsáveis pela biodisponibilidade oral dos bioativos incluem: a bioacessibilidade, quando o composto é liberado da matriz do alimento absorvido; a absorção durante a digestão; a distribuição, quando os compostos são transferidos para o interior ou para o exterior das células; e o metabolismo, que se trata da

transformação química ou bioquímica do composto (SALVIA-TRUJILLO; MARTIN-BELLOSO; JULIAN MCCLEMENTS, 2016).

Para contornar as limitações dos compostos bioativos, várias técnicas de encapsulamento foram desenvolvidas para nanoencapsulá-los, como emulsão (PISOSCHI et al., 2018), gelatina por eletrofiação (SHISHIR et al., 2018), nanogéis, nanoesponjas (REZAEI; FATHI; JAFARI, 2019) e dispersão sólida (SILVA SÁ et al., 2019).

A nanotecnologia ainda possui alguns desafios em relação aos danos que sua aplicação pode acarretar no ser humano, sendo relevante verificar a toxicidade das nanopartículas para a avaliação de seu risco à saúde (HE; HWANG, 2016; KUMAR et al., 2020). A toxicologia pode ser definida como um efeito adverso de agentes físicos, químicos e biológicos nos seres humanos, animais e meio ambiente. A toxicidade das nanopartículas advém de inúmeros fatores, incluindo a composição química, propriedades estruturais e até mesmo a quantidade de dosagem (KUMAR et al., 2020).

Apesar do investimento em desenvolvimento de drogas relacionadas a doenças degenerativas, como o Parkinson, Alzheimer e câncer, por exemplo, somente uma em cada 5.000 dessas drogas é aprovada pela *Food and Drug Administration* (FDA) dos Estados Unidos, e apenas 5% desses medicamentos conseguem alcançar a Fase I dos testes clínicos. Portanto, há uma necessidade de verificar a toxicidade das drogas em organismos modelo adequados que possam ser de fácil manipulação genética para estudos pré-clínicos (YADAV; SRIKRISHNA; GUPTA, 2016).

Atualmente, várias espécies estão sendo utilizadas como organismo modelo para estudos *in vivo* de toxicologia, como insetos (*Drosophila*), peixes (*Danio rerio* ou peixe-zebra) e mamíferos como camundongos e ratos, devido à proximidade filogenética desses animais com os humanos (ONG et al., 2014; ANDERSEN; WINTER, 2017).

*Drosophila melanogaster* é um organismo estudado experimentalmente há mais de 100 anos, utilizado pela primeira vez por Thomas Hunt Morgan como modelo de pesquisa em 1909 (ONG et al., 2014; YAMAGUCHI; YOSHIDA, 2018). Igualmente conhecida como mosca da fruta, este inseto demanda um baixo custo de manutenção, propagação e triagem em comparação com outros organismos modelos baseados em mamíferos, como os roedores (DOKE; DHAWALE, 2015).



A *Drosophila melanogaster* também possui importante função como modelo em pesquisas, como de ajudar a elucidar o papel do transportador vesicular de acetilcolina na transmissão sináptica (WHITE et al., 2020). Existem dois tipos de colinesterases: a acetilcolinesterase (AChE) e a butirilcolinesterase (BChE), e ambas distribuídas abundantemente em todo o reino animal (POPE; BRIMIJOIN, 2018).

A demanda por inibidores da colinesterase (ChIs) capazes de interromper a degradação da acetilcolina existe, porém, o uso de ChIs vem constantemente acompanhado de alguns efeitos colaterais indesejáveis, como diarreia, náuseas, vômitos, insônia, fadiga e anorexia (AGUNLOYE; OBOH; FALADE, 2020; MA et al., 2020), o que faz necessário mais estudos nessa área.

Estudos relatam que a berberina possui a capacidade de inibir a atividade da AChE (MAK et al., 2014), tem efeitos contra doenças neurodegenerativas (FAN et al., 2019) e capacidade de prolongar a vida útil das moscas (NAVROTSKAYA et al., 2012). Além disso, a berberina reduz o nível de espécies reativas de oxigênio (ROS), como ânions superóxido, óxido nítrico e peroxinitrito e restaura as enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), glutatona peroxidase (GPx) e catalase (CAT) em animais, por exemplo, em ratos imunodeficientes como descrito no estudo de Zhang et al. (2011).

Portanto, o objetivo deste estudo foi verificar a toxicidade da berberina analisando as atividades da AChE e BChE juntamente com marcadores antioxidantes como CAT, SOD e Tióis Totais em tecidos de *Drosophila melanogaster*.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Avaliar a toxicidade de dispersões sólidas contendo berberina, analisando as atividades das enzimas AChE e BChE e das enzimas antioxidantes CAT, SOD e Tióis Totais em *Drosophila melanogaster*.

### 2.2 Objetivos Específicos

Os objetivos específicos do trabalho são:

- Produzir nanopartículas contendo berberina pela técnica de dispersão sólida;
- Caracterizar as nanopartículas pelas técnicas de: Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM), a fim de determinar a morfologia das nanopartículas; Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC), a fim de investigar o comportamento térmico da amostra; Espectrofotometria no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR), para medir quão bem uma amostra consegue absorver radiação a um determinado comprimento de onda e Espectroscopia de Absorção na Região do Ultravioleta-Visível (UV-Vis), para verificar as bandas de absorção do composto fitoquímico estudado;
- Analisar em modelos *in vivo* os efeitos da berberina livre solubilizada em água e etanol, e nanopartículas contendo berberina nas moscas *Drosophila melanogaster* através do teste de sobrevivência;
- Analisar em testes *ex vivo* as atividades enzimáticas da acetilcolinesterase e butirilcolinesterase em *Drosophila melanogaster* expostas a diferentes concentrações de berberina livre solubilizada em água e etanol, e nanopartículas contendo berberina;
- Analisar em testes *ex vivo* as atividades das enzimas antioxidantes (CAT, SOD e Tióis Totais) em tecidos de *Drosophila melanogaster*.

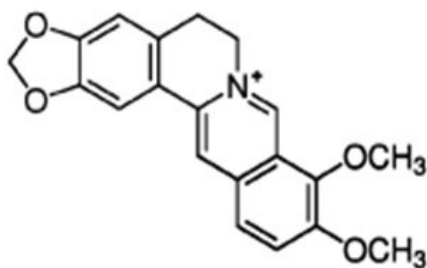
### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 Berberina

Compostos bioativos ou fitoquímicos são encontrados em plantas, frutas, hortaliças e regularmente utilizados na área medicinal devido a inúmeros benefícios que possuem à saúde humana, dentre eles, ação antioxidante, melhora da visão, diminuição do colesterol, anti-inflamatório e proteção de doenças cardiovasculares. Esses compostos de origem vegetal também estão presentes na indústria alimentícia, porém, a maioria são altamente lipofílicos possuindo baixa solubilidade em água, baixa absorção e perda de biodisponibilidade oral, o que dificulta sua adição na maior parte dos alimentos (BARBOSA; FERNANDES, 2014; CODEVILLA et al., 2015). Os compostos bioativos podem ser compostos alcaloides, flavonoides, fenólicos, carotenoides, óleos essenciais, taninos, dentre outros (CODEVILLA et al., 2015).

A berberina (Figura 1) é um alcaloide isoquinolínico retirado de plantas (principalmente raízes, caules e rizomas) de espécies como *Berberis vulgaris*, *Berberis aquifolium*, *Berberis aristata*, pertencentes à família da Berberidaceae encontradas principalmente nos continentes asiático e europeu. Também conhecida como "amarelo natural 18", de flores amareladas e frutos vermelhos (Figura 2), a BBR é o corante da classe das piridinas de gosto amargo e planta cujo arbusto possui entre 1 e 3 metros de altura e ainda pode ser isolada de outras plantas como *Coptis chinensis*, *Hydrastis canadenses*, *Phellodendris sp* e *Arcangelisia flava* (SCHOR, 2012; WANG et al., 2017). Uma característica corriqueira dos alcaloides vegetais é o sufixo – *ina* devido serem aminas (SNEADER, 2006).

Figura 1 – Estrutura química da berberina



Fonte: KULKARNI; DHIR, (2010)

**Figura 2 – Fonte de berberina *Berberis vulgaris***



**Fonte: WANG et al., (2017)**

Desde 1911 a berberina tem sido largamente utilizada na medicina tradicional chinesa e indiana para o tratamento de diabetes, diarreias e disenterias agudas. Além disso, estudos sobre os efeitos da BBR contra doenças neurodegenerativas como a doença de Alzheimer (DA) e a doença de Parkinson (DP), estão sendo realizados (JUNG et al., 2008; YIN; YE; JIA, 2012).

### **3.2 Nanotecnologia: Nanoencapsulação e Nanotoxicidade**

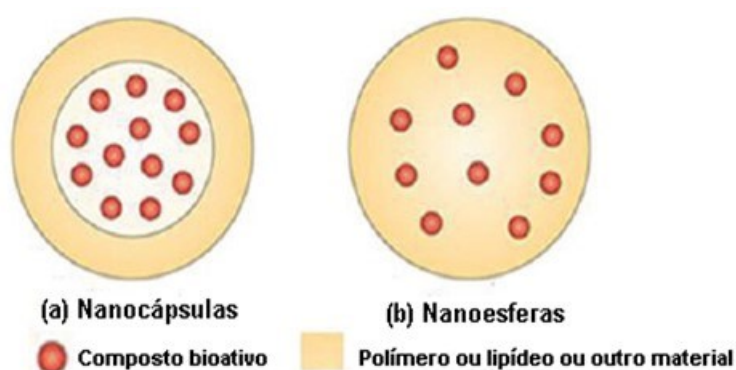
O avanço da tecnologia em relação à indústria alimentícia é incontestável nas últimas décadas. A nanotecnologia, embora ainda pouco conhecida, está sendo utilizada pelas indústrias visando o uso da escala nanométrica ( $10^{-9}$  m) na elaboração de novos produtos, além de contornar limitações relevantes da maioria dos compostos bioativos, como de serem lipofílicos e de possuírem gostos amargos e/ou adstringentes. A utilização da nanotecnologia é primordial para o desenvolvimento de métodos que possam preservar os compostos naturais da degradação, reação e oxidação com outros materiais durante todo o processamento dos produtos (WANG et al., 2012; CODEVILLA et al., 2015; SIQUEIRA; FORTUNATO; FILHO, 2017).

A nanoencapsulação é uma técnica inovadora e emergente com importantes aplicações em áreas como as indústrias alimentícia e farmacêutica, que consiste em envolver materiais líquidos, sólidos ou gasosos dentro de pequenas cápsulas com diâmetro de escala nanométrica sob a forma de nanopartículas lipídicas sólidas, nanoemulsões, nanocápsulas e nanoesferas, por exemplo. As nanopartículas

lipídicas sólidas são sistemas coloidais, sendo que o tamanho varia de 10 a 1000 nm de diâmetro e são divididas em nanocápsulas ou nanoesferas (NEDOVIC et al., 2011; ASSIS et al., 2012; BAZANA et al., 2015).

Nas nanocápsulas, sistema vesicular, o composto bioativo pode se localizar no núcleo e envolto por uma membrana polimérica ou ainda adsorvido à membrana (Figura 3a). Já nas nanoesferas, sistema matricial, o bioativo pode se espalhar de maneira uniforme na matriz polimérica (Figura 3b) (BAZANA et al., 2015; CODEVILLA et al., 2015).

**Figura 3 – Representação das nanocápsulas (a) e nanoesferas (b)**



**Fonte: Adaptado de Bazana et al., (2015)**

Na indústria de alimentos, se utiliza a nanoencapsulação devido a seus diversos benefícios, como de proteger os ativos contra a degradação e agentes externos (luz, umidade e calor). Além disso, aumenta a solubilidade, biodisponibilidade, estabilidade, defesa contra a oxidação e fatores ambientais (pH, temperatura), ainda pode mascarar sabor e/ou aroma, retém os compostos voláteis e aumenta a vida de prateleira dos produtos (NEDOVIC et al., 2011; BAZANA et al., 2015; SUGANYA; ANURADHA, 2017).

A eficiente absorção, proteção e controle da liberação dos compostos naturais faz da encapsulação uma tecnologia favorável para encapsular compostos bioativos (FORTUNATO; SIQUEIRA; FILHO, 2017). A baixa solubilidade em água e pouca biodisponibilidade destes compostos nos alimentos justificam a nanoencapsulação (CODEVILLA et al., 2015).

Um dos desafios da nanotecnologia, é que ainda não se conhecem por completo os efeitos contrários que sua aplicação pode causar em humanos a longo prazo (SIQUEIRA; FORTUNATO; FILHO, 2017). A forma, tamanho pequeno, composição de produtos químicos, estrutura e o aumento da área de superfície são algumas características dos nanomateriais que podem colocar a saúde humana em risco por meio da indução dos efeitos sobre os órgãos, tecidos e/ou células (DI SIA, 2017). Desse modo, torna-se importante avaliar a toxicidade das nanopartículas de modo a certificar sua segurança.

A toxicologia é a ciência que estuda os efeitos adversos de agentes de natureza biológica, física ou química sobre os biosistemas, tendo como intuito o tratamento, o diagnóstico e, principalmente, a prevenção da intoxicação. Já a nanotoxicologia é um conceito recente que surgiu como uma subdivisão da ciência toxicológica tendo como alvo o estudo dos nanomateriais (MARTINEZ; ALVES, 2013; LAZZARETTI; HUPFFER, 2018).

### 3.2.1 Técnicas de Nanoencapsulação

Para que a BBR possa ser utilizada em aplicações alimentícias, farmacológicas e/ou clínicas é necessária a melhoria da sua biodisponibilidade oral, o que torna essencial a análise dos fatores que levam esse composto a possuir baixa biodisponibilidade (SAHIBZADA et al., 2018). O estudo de Liu et al. (2016) indica que a baixa solubilidade em água afeta a biodisponibilidade, devido à baixa dissolução do fármaco dentro do organismo e, por sua vez, a fraca biodisponibilidade oral da BBR está relacionada a uma baixa absorção do fármaco na parede intestinal, bem como no fígado, assim como a baixa absorção pode estar ligada à baixa permeabilidade da membrana. Desse modo, a concentração plasmática esperada para que a ação do fármaco ocorra não é alcançada.

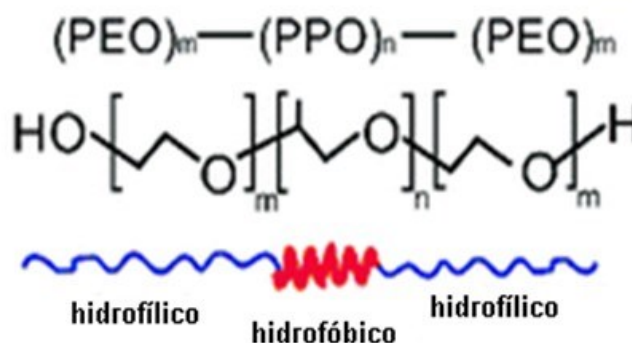
Para solucionar problemas de baixa solubilidade de compostos como a BBR, diversas técnicas foram adotadas para a produção de nanopartículas, como a nanoprecipitação, nanolipossomos, gelificação iônica, emulsificação de óleo em água, evaporação de solvente de emulsão, nanopartículas lipídicas sólidas e a secagem por pulverização (GHARSALLAOUI et al., 2007; ASSIS et al., 2012; MEHRA; SHEORAIN; KUMARI, 2016; JAFARI, 2017).

Outra técnica utilizada para a nanoencapsulação dos compostos bioativos é a dispersão sólida, historicamente criada por Sekiguchi e Obi (1961). O método consiste em adicionar o bioativo e o polímero em um solvente orgânico que possua capacidade de dissolver simultaneamente as duas substâncias, seguido por dispersores causando a diminuição do tamanho das partículas e, finalizando, a evaporação completa do solvente.

A dispersão sólida é considerada uma técnica econômica e viável para aumentar a biodisponibilidade de compostos lipofílicos, ou seja, bioativos com baixa solubilidade aquosa. O aumento da solubilidade desses compostos se baseia em três principais mecanismos: a molhabilidade do composto (que é melhorada através do contato direto com a matriz hidrofílica), a diminuição do tamanho das partículas (tendo o aumento da área da superfície) e a conversão do estado cristalino para o estado amorfo mais solúvel (FRIZON et al., 2013).

O Poloxamer 407 (Figura 4) é um copolímero anfifílico de bloco A – B – A não iônico formado de duas cadeias "A" hidrofílicas (poli (óxido etileno)) (PEO) e uma cadeia "B" hidrofóbica (poli (óxido propileno)) (PPO) que tem sido comumente utilizado em fármacos como surfactante e agente solubilizante, por exemplo. Esse polímero ativo de superfície possui uma grande compatibilidade com outros produtos químicos, além de apresentar baixa toxicidade e alta capacidade de solubilização em diversas drogas, como a berberina (ZHANG et al., 2002; AL-OBAIDY; GREENWAY; PAUNOV, 2019; SILVA SÁ et al., 2019).

**Figura 4 – Estrutura química do copolímero P407**



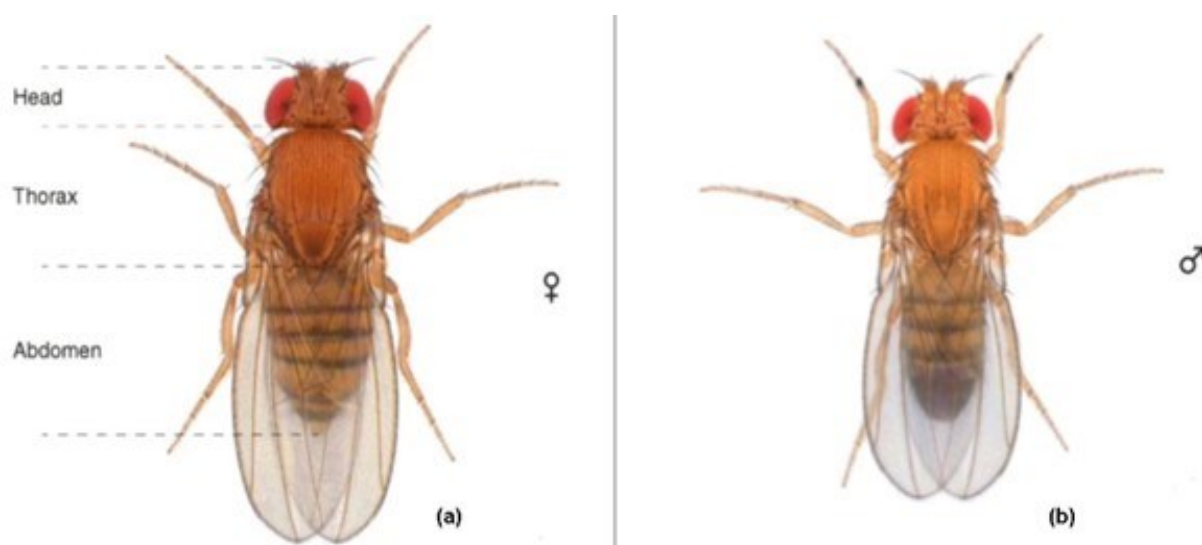
Fonte: Adaptado de Al-Obaidy; Greenway; Paunov, (2019)

### 3.3 *Drosophila melanogaster*

*Drosophila melanogaster* ou mosca da fruta, é um organismo eucarionte que vem sendo estudado há mais de cem anos (PANDEY; NICHOLS, 2011). O inseto de tamanho pequeno (~3 mm de comprimento) é dividido em três principais partes: cabeça, tórax e abdômen, e sua forma predominantemente selvagem (*wild-type*) apresenta olhos vermelhos e listras pretas pelo abdômen (CHYB; GOMPEL, 2013; BAENAS; WAGNER, 2019).

A mosca da fruta é uma espécie que apresenta dimorfismo sexual, onde as fêmeas geralmente possuem um tamanho maior do que os machos (mas isso pode variar de acordo com a idade, condições de cultura e/ou antecedentes genéticos). O abdômen das fêmeas dispõe de uma ponta pontiaguda, enquanto que o abdômen dos machos possui uma forma arredondada, sendo alguns fatores de distinção do sexo (Figura 5).

Figura 5 – Diferenças no tamanho e abdômen de *Drosophila melanogaster* fêmea (a) e macho (b)



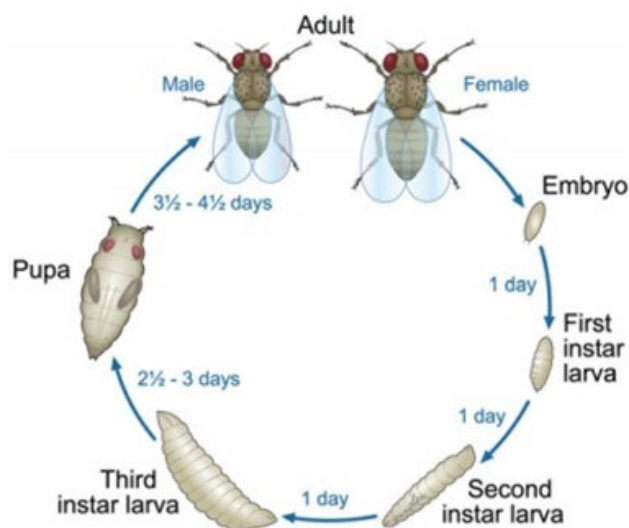
Fonte: Adaptado de Chyb; Gompel, (2013)

O uso regular dessas moscas em pesquisas decorre da facilidade em mantê-las em laboratório. Além disso, são amplamente utilizadas para análise dos efeitos do tempo, isso porque seu ciclo reprodutivo é rápido, cerca de 10 -12 dias (Figura 6). O ciclo de vida também é curto, em torno de 60 dias a 25 °C, o que permite estudá-las



por várias gerações (ORSOLIN; NEPOMUCENO, 2009; ALVES; NEPOMUCENO, 2011).

**Figura 6 – Estágios de desenvolvimento da *Drosophila*: embrião, larva (primeiro ínstar, segundo ínstar e terceiro ínstar), pupa e adulto**



Fonte: ONG et al., (2014)

Devido a tais vantagens, a *Drosophila* vem substituindo roedores e outros mamíferos como organismo modelo para estudos *in vivo* de toxicologia, já que a utilização de mamíferos para a toxicidade de nanomateriais é limitada devido ao alto custo operacional e objeções éticas discutidas por organizações de direitos dos animais. A aplicação de nanomateriais em produtos biomédicos e de consumo causa bastante preocupação em virtude da sua frequente associação com a toxicidade em estudos *in vitro* mais precisamente no campo da nanotoxicidade (ONG et al., 2014).

As moscas da fruta têm sido um modelo genético eficaz e amplamente exploradas como ferramenta para estudos. Elas possuem cerca de 14.000 genes em quatro cromossomos, sendo que três desses carregam a maior parte do genoma (PANDEY; NICHOLS, 2011). Acredita-se que até 75% dos genes associados a doenças humanas tenham um correspondente identificável na *Drosophila melanogaster* (ARAUJO et al., 2015; CALAP-QUINTANA et al., 2017).

Recentemente, essas moscas foram usadas por muitos pesquisadores como modelo para compreender várias doenças neurodegenerativas, como a DA e DP em humanos (ARAUJO et al., 2015). Além disso, Navrotskaya et al. (2012) observaram a ação da berberina no tempo de vida das moscas *versus* temperatura, descobrindo

através de seu estudo que a berberina consegue prolongar o tempo de vida das *Drosophila melanogaster* mantidas em temperatura ambiente de 23°C.

### 3.4 Atividade Enzimática

A acetilcolina (ACh) atua como neurotransmissor, transmitindo os impulsos nervosos entre as células por todo o sistema nervoso. Algumas funções como a memória e aprendizado, o alerta e o controle motor, estão relacionadas com os neurônios colinérgicos. Tais funções são afetadas quando há baixos níveis de ACh em regiões específicas do cérebro (HUANG et al., 2010; MOTA et al., 2012). Desse modo, para aumentar os níveis de ACh, indica-se que o potencial terapêutico seja por meio da inibição da acetilcolinesterase (HUANG et al., 2010).

A AChE (EC 3.1.1.7) é uma enzima que possui uma ação de extrema importância no impulso nervoso. Sendo da família das colinesterases (ChE), ela tem a capacidade de fragmentar a ação da ACh hidrolisando-a em acetato e colina na fenda sináptica presente no corpo humano (MOTA et al., 2012). A AChE hidrolisa preferencialmente a ACh e é inativa no substrato de butirilcolina (BCh), enquanto que a BChE (EC 3.1.1.8) é menos seletiva hidrolisando tanto a ACh quanto a BCh comparativamente (PEZZEMENTI; NACHON; CHATONNET, 2011).

A AChE é amplamente encontrada no sistema nervoso central, membrana dos eritrócitos e nos músculos esqueléticos. Já a BChE, é abundantemente encontrada no plasma sanguíneo, sendo também conhecida como colinesterase plasmática (ARAÚJO; SANTOS; GONSALVES, 2016).

A deficiência dos compostos antioxidantes ou a elevada atividade enzimática de algumas enzimas podem estar relacionados à doença de Alzheimer (DA) e doença de Parkinson (DP). A doença neurodegenerativa mais comum é a DA que é caracterizada por prejuízos progressivos na memória e habilidades cognitivas com uma idade geralmente tardia, embora o início possa ocorrer até a quarta década de vida (entre 30 e 39 anos). A segunda doença neurodegenerativa mais comum relacionada à idade é a DP que é clinicamente caracterizada por rigidez muscular, instabilidade postural e tremor, sendo causada pela degeneração de neurônios dopaminérgicos (PANDEY; NICHOLS, 2011).

Essas doenças atingem principalmente pessoas idosas maiores de 65 anos em todo o mundo, avaliadas com déficits funcionais e cognitivos. Tais déficits estão relacionados com a deficiência colinérgica devido a diminuição especialmente dos níveis de ACh (MOTA et al., 2012; SILVA SÁ et al., 2019).

Considerando que ainda não existe cura efetiva da DA, a alternativa empregada para diminuir ou retardar a deficiência colinérgica e aliviar os sintomas e variantes comportamentais observados na doença se fundamenta principalmente na utilização de inibidores das ChE. Sugere-se que os inibidores da AChE (AChEIs) conseguem impedir que a AChE destrua a ACh (JIANG; LI; LI, 2015).

Estima-se que 80% dos medicamentos utilizados na DA, com a aprovação da FDA, agem como inibidores da AChE (MAK et al., 2014), dentre eles, donepezil, tacrina, rivastigmina e galantamina (HUANG et al., 2010; SU et al., 2013). Porém, esses inibidores possuem efeitos colaterais, como superativação do sistema colinérgico periférico e hepatotoxicidade (MAK et al., 2014).

O estudo de Huang et al. (2010), mostra que a berberina pode inibir a AChE, o que sugere que a mesma seja um composto apropriado para o desenvolvimento de medicamentos para DA (HUANG et al., 2012). Compostos bioativos como a BBR, vem mostrando um grande potencial terapêutico contra doenças neurodegenerativas, inclusive em testes com animais como ratos e camundongos ou invertebrados como a *Drosophila melanogaster*, por exemplo (JIANG; LI; LI, 2015).

Os insetos em sua maioria possuem dois tipos de genes AChE (*ace1* e *ace2*), no entanto, apenas o (*ace2*) está presente nas moscas da fruta e é o gene responsável por codificar a AChE sináptica envolvida na função vital desses animais (KIM et al., 2011; KAUR et al., 2015).

### **3.5 Enzimas Antioxidantes**

Os antioxidantes são substâncias capazes de neutralizar e/ou eliminar os radicais livres antes de causar danos às células do corpo. Inúmeras enzimas antioxidantes de defesa natural foram identificadas como eliminadoras de radicais livres, como a glutatona (GSH), a catalase (CAT, EC 1.11.1.6), o superóxido dismutase (SOD, EC 1.15.1.1), a glutatona S-transferase (GST, EC 2.5.1.18), a

glutathione peroxidase (GPx, EC 1.11.1.9), o ácido ascórbico, dentre outros antioxidantes (MANASA; ASHADEVI, 2015; ABOLAJI et al., 2017).

Análises *in vitro* e em modelos animais *in vivo* vem sendo realizadas para a investigação do potencial das enzimas antioxidantes na avaliação das condições dos efeitos terapêuticos ligadas ao estresse oxidativo referente ao desequilíbrio redox (YANG; LEE, 2015).

As enzimas antioxidantes executam um importante papel na redução dos níveis de espécies reativas de oxigênio (EROs) e reduzem o estresse oxidativo em sistemas biológicos. As EROs podem ser representadas, por exemplo, pelo radical ânion superóxido ( $\cdot\text{O}_2^-$ ), radical hidroxila ( $\text{OH}^-$ ) e peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) (MANASA; ASHADEVI, 2015; YANG; LEE, 2015). Em altas concentrações, as EROs podem danificar a estrutura dos aminoácidos, carboidratos, proteínas, lipídios e ácido nucleicos dos tecidos, impedindo assim a realização de suas funções normais (ABOLAJI et al., 2015, 2017).

O estresse oxidativo pode ser definido como um estado de produção exagerada de EROs e/ou de uma redução excessiva de antioxidantes, que resulta em alterações no equilíbrio redox celular (ABOLAJI et al., 2015; HENKEL; SAMANTA; AGARWAL, 2018). Em humanos, o estresse oxidativo está ligado a diversas doenças, como o câncer, diabetes mellitus, aterosclerose e doenças neurodegenerativas (DA e DP) (GARCIA-GARCIA et al., 2012; YANG; LEE, 2015).

A glutathione (GSH) é um tripeptídeo composto de glicina, cisteína e ácido glutâmico, que se encontra na maioria dos tecidos principalmente no fígado em altas concentrações, e atua na proteção de eritrócitos, hepatócitos e outras células contra danos tóxicos (ABOLAJI et al., 2015; GUPTA, 2016).

A GSH executa um importante papel como antioxidante na célula devido a sua estrutura possuir grupo tiol ( $-\text{RSH}$ ). Sendo assim, ela atua tanto diretamente eliminando diversas EROs, entre elas os radicais ( $\cdot\text{O}_2^-$ ) e ( $\text{OH}^-$ ), quanto indiretamente servindo como substrato para a enzima GST e como co-fator para a enzima glutathione peroxidase (GPx) (ALIAGA et al., 2016).

A glutathione peroxidase por meio de uma reação química em que a GSH é oxidada (glutathione oxidada (GO)), tem a função de reduzir o  $\text{H}_2\text{O}_2$  e os peróxidos lipídicos. Por outro lado, a GO pode ser reduzida de volta a GSH através da enzima glutathione reductase (GR, EC 1.6.4.2), que requer como fonte de energia o NADPH, e

certifica que a GSH em sua maioria esteja presente na forma reduzida nas células (ABOLAJI et al., 2015; ALIAGA et al., 2016). É essencial a capacidade que a célula tem de regenerar GSH da GO para a conservação do equilíbrio redox (ALIAGA et al., 2016).

A catalase (CAT) é uma enzima que protege as células dos radicais livres de oxigênio, conseguindo degradar o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em água e oxigênio (HADWAN; ALI, 2018; BAG; MISHRA, 2020). Ao decompor o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em água e oxigênio, a CAT impede que as células sejam danificadas, já que quando há alta concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dentro das células, o estresse oxidativo ocorre podendo acarretar danos irreversíveis às mesmas (BAG; MISHRA, 2020).

Diversos métodos para a determinação da atividade da CAT foram desenvolvidos, sendo mais utilizados os que envolvem determinações espectrofotométricas de UV de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 240 nm (HADWAN; ALI, 2018).

A superóxido dismutase (SOD) é uma das enzimas celulares mais importantes utilizadas contra o estresse oxidativo das EROs (BAFANA et al., 2011) e é responsável pela dismutação do superóxido em peróxido de hidrogênio e oxigênio. Na sequência, o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> é convertido em água e oxigênio molecular através de outras enzimas como catalase e peroxidases. A SOD é encontrada em praticamente todos os organismos aeróbicos, desde microrganismos a seres humanos (BAFANA et al., 2011; DORAN et al., 2017; WANG et al., 2018).

Desse modo, existe a demanda por bioativos naturais nanotransformados para uso em formulações alimentícias, bem como existe a necessidade de se dispor de informações sobre a toxicidade desses sistemas. Nesse contexto, o uso de modelos *in vivo* utilizando *Drosophila melanogaster* pode auxiliar no entendimento de dispersões sólidas contendo berberina.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Material

O polímero Kolliphor® Poloxamer 407 (massa molar de 12.220 g/mol, Sigma-Aldrich), e os compostos cloreto de berberina (90% de pureza, Sigma-Aldrich), álcool etílico (99,8 % de pureza, Dinâmica) e o surfactante Tween 80 P.S. (Dinâmica) foram utilizados na obtenção das nanopartículas. Brometo de potássio (grau espectroscópico, Sigma-Aldrich) foi utilizado nas análises de Espectroscopia de Infravermelho. Para as análises com a *Drosophila melanogaster* foi utilizado o Metilparabeno (99%, Neon) como antifúngico e reagentes como ágar, farinha de milho, fermento biológico, leite em pó, sacarose e sal foram adquiridos em comércio local. Para as análises enzimáticas da AChE e BChE foram utilizados Tris-HCl (Dinâmica), DTNB (Sigma-Aldrich), iodeto de acetiltiocolina (Sigma-Aldrich) e S-butirilthiocolina (Sigma-Aldrich), enquanto utilizou-se fosfato de potássio monobásico e dibásico (99% de pureza, Dinâmica) para a obtenção do Tampão Fosfato de Potássio [TFK, pH (7,0 e 7,5)]. Por fim, ambos TFK, TEMED (Sigma-Aldrich), EDTA (Sigma-Aldrich) e quercetina (98% de pureza, Sigma-Aldrich) foram utilizados para a determinação da atividade das enzimas antioxidantes.

### 4.2 Produção das Nanopartículas de Berberina

As nanopartículas foram obtidas utilizando a técnica de dispersão sólida de acordo com Almeida et al. (2018), com pequenas modificações. O Tween 80 (0,19 g) foi misturado com 800 ml de álcool etílico sob agitação branda. Logo após, foram adicionados 19,2 g de polímero P407 e agitou-se por 5 minutos sob aquecimento de 40 °C. Posteriormente, foi adicionada a berberina (1,92 g) e agitou-se até a solubilização completa do composto. A solução foi sonicada (Fisher Scientific, 120 W, ponteira de 1/8") por 3 minutos (30 segundos de agitação e 10 segundos de pausa) imersa em banho de gelo. A eliminação do solvente ocorreu em estufa de circulação forçada a 50 °C por 18 horas. As amostras foram então acondicionadas em frascos protegidos da luz e armazenados a 10 °C.

### 4.3 Caracterização das Nanopartículas

A técnica de Microscopia de Transmissão Eletrônica (TEM; JEOL modelo JEM 2100, 200 kV) foi aplicada para a caracterização morfológica das nanopartículas. As amostras foram diluídas em água e gotejadas sobre uma grade de cobre (300 mesh), cobertas com parlódio/carbono e secas ao ar em temperatura ambiente. Após a secagem, as imagens foram capturadas.

As medições da caracterização por Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC; Perkin Elmer 4000) foram utilizadas para avaliar o estado físico da berberina e das nanopartículas após o processo de encapsulação. Cerca de 5 a 10 mg do analito foram alocadas em porta-amostras de alumínio fechados e mantidos em 0 °C por 5 minutos e, logo após, aquecidos até 400 °C a 10 °C min<sup>-1</sup> sob um fluxo de nitrogênio de 50 mL.min<sup>-1</sup>, segundo Almeida et al. (2018) com pequenas modificações.

As análises de Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR; Shimadzu-Iraffinity-1) foram realizadas para a confirmação da estrutura e para a observação da existência de possíveis interações químicas entre os reagentes utilizados no processo da produção de nanopartículas de berberina. Para os experimentos, utilizou-se cerca de 0,002 g de amostra para produção de pastilhas de brometo de potássio (0,2 g) que posteriormente foram analisadas com resolução de 2 cm<sup>-1</sup> na faixa de 4750 – 450 cm<sup>-1</sup> e 32 *scans* cumulativos segundo Silva Sá et al. (2019).

A técnica de Espectroscopia de Absorção na Região do Ultravioleta-Visível (UV-Vis) foi realizada para verificar a banda de absorção do composto estudado, a fim de avaliar a qualidade das amostras sintetizadas e identificar possíveis mudanças de forma e tamanho das nanopartículas durante a síntese. Nesse experimento foi utilizado um espectrofotômetro portátil de fibra (Red Tibe modelo USB650 UV), na faixa de comprimento de onda entre 200 e 850 nm, elaborado para medição de amostras líquidas. A técnica utilizou de cubeta de quartzo de 1 cm de caminho óptico e foram preparadas soluções estoque de berberina livre e nanoencapsulada, 74,2 µg.mL<sup>-1</sup> e 360 µg.mL<sup>-1</sup>, respectivamente, em água destilada.

Para as análises de caracterização das partículas foram utilizadas as seguintes amostras: berberina, nanopartículas de berberina (NPs-berberina), polímero

Poloxamer (P407) e uma mistura manualmente obtida de berberina e P407 que foi denominada de mistura física.

#### 4.4 Análises Biológicas

Foram utilizadas *Drosophila melanogaster* (linhagem Harwich) adultas e de ambos os gêneros, mantidas em frascos de vidro na incubadora BOD, sob condições controladas de luz (ciclo claro/escuro de 12 horas), temperatura ( $24 \pm 1^\circ\text{C}$ ) e umidade (40 %), alimentadas com meio padrão (78,72% de água; 21,0% de mistura (96,2% de farinha de milho, 2% de sacarose, 1,6% de leite em pó, 0,2% de cloreto de sódio (NaCl)); 0,23% álcool etílico e 0,05% antifúngico metilparabeno e fermento biológico).

##### 4.4.1 Ensaio *in vivo*

###### 4.4.1.1 Teste de sobrevivência

A taxa de sobrevivência foi avaliada utilizando moscas jovens (2-3 dias) de ambos os sexos. Primeiro foi realizada a sincronização, onde os vidros contendo o meio padrão em boas condições de sobrevivência e com maior número de larvas a serem separados. Após a eclosão das larvas (2-3 dias) as moscas ficaram mantidas por um período de 2 dias até tornarem-se adultas e então, iniciar os testes. No terceiro dia após a eclosão, as moscas foram adormecidas em freezer e 100 moscas foram transferidas para meio de análise (1% de ágar; 1% de levedura; 0,05% de sacarose; 1% de leite em pó; 0,08% de metilparabeno) com concentrações finais diferentes de nanopartículas de berberina (controle água; 3; 10; 30 e 100  $\mu\text{M}$ ), de berberina livre (controle água; 3; 10; 30 e 100  $\mu\text{M}$ ) e de berberina livre (controle etanol; 3; 10; 30 e 100  $\mu\text{M}$ ). A taxa de sobrevivência foi avaliada pela contagem diária do número de moscas mortas até o final do período experimental (5 dias) após a exposição a estas concentrações. O teste foi realizado segundo Soares et al. (2018) com algumas modificações.



#### 4.4.2 Ensaio *ex vivo*

##### 4.4.2.1 Preparação do homogeneizado

O protocolo foi realizado segundo Silva Sá et al. (2019), onde 100 moscas por grupo foram separadas e imobilizadas em gelo por aproximadamente 10 minutos. Logo após, utilizando um bastão de vidro, foram homogeneizadas manualmente em tampão Tris-HCl (50 mM, pH 7,4) com proporção de 1:10 (mosca/volume (em  $\mu\text{L}$ )).

O homogeneizado resultante das moscas foi centrifugado a 10.000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante (S1) foi removido, armazenado em  $-80^{\circ}\text{C}$  e utilizado para as análises bioquímicas posteriores. Os sobrenadantes utilizados foram de nanopartículas de berberina (controle água; 3; 10; 30;100  $\mu\text{M}$ ), berberina livre solubilizada em água (controle água; 3; 10; 30;100  $\mu\text{M}$ ) e berberina livre solubilizada em etanol (controle etanol; 3; 10; 30;100  $\mu\text{M}$ ).

##### 4.4.2.2 Atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE, EC 3.1.1.7)

A determinação da análise enzimática da AChE em microplacas foi de acordo com Ellman et al. (1961) e Pereira et al. (2004) com algumas modificações. Foram utilizados os reagentes TFK [tampão fosfato de potássio], DTNB [5,5'-Dithiobis (ácido 2-nitrobenzóico)] (Sigma-Aldrich), iodeto de acetiltiocolina (ASCh) (Sigma-Aldrich) e água MiliQ.

O meio da reação conteve 50  $\mu\text{L}$  de TFK 50 mM (pH 7,5), 85  $\mu\text{L}$  de água MiliQ e 25  $\mu\text{L}$  do S1. Logo após foi adicionado 20  $\mu\text{L}$  de DTNB para ser realizada a primeira leitura (Branco). Em seguida, foi adicionado 20  $\mu\text{L}$  de substrato ASCh para a segunda leitura das amostras, completando 200  $\mu\text{L}$  de volume final. As absorbâncias foram medidas a cada 60 segundos durante 4 minutos, sendo detectadas a 405 nm no equipamento leitor de microplaca (Thermoplate). A atividade enzimática foi expressa em porcentagem (%) em relação ao controle. Neste método foi detectado uma coloração amarelada devido a reação do DTNB com o substrato ASCh pela enzima.

#### 4.4.2.3 Atividade da enzima butirilcolinesterase (BChE, EC 3.1.1.8)

A determinação da análise enzimática da BChE em microplacas foi de acordo com Ellman et al. (1961) com algumas modificações. O meio da reação conteve 50  $\mu\text{L}$  de TFK 50 mM (pH 7,5), 85  $\mu\text{L}$  de água MiliQ e 25  $\mu\text{L}$  do S1. Logo após foi adicionado 20  $\mu\text{L}$  de DTNB para ser realizada a primeira leitura (Branco). Em seguida, foi adicionado 20  $\mu\text{L}$  de substrato BSCh para a segunda leitura das amostras, completando 200  $\mu\text{L}$  de volume final. As absorbâncias foram medidas a cada 60 segundos durante 4 minutos, sendo detectadas a 405 nm no equipamento leitor de microplaca (Thermoplate). A atividade enzimática foi expressa em porcentagem (%) em relação ao controle.

#### 4.4.2.4 Determinação de tióis totais

A determinação do nível de tióis totais foi realizada de acordo com Ellman (1959) com algumas modificações. Neste método, primeiramente foram adicionados 200  $\mu\text{L}$  de água, 30  $\mu\text{L}$  de TFK 50 mM (pH 7,5) e 10  $\mu\text{L}$  de S1. Logo após, foi realizada a leitura do branco. Posteriormente, adicionou-se 10  $\mu\text{L}$  do ácido 5,5-ditiobis-2-nitrobenzóico (DTNB) e a solução seguiu para uma incubação de 10 minutos à temperatura ambiente. Após este tempo, a leitura foi realizada em 405 nm em leitor de placa (Thermoplate) e a atividade de tióis totais foi expressa em % do controle.

#### 4.4.2.5 Atividade da enzima catalase (CAT)

A determinação da atividade da catalase foi realizada de acordo com Aebi (1984). Neste método, foram adicionados em cubeta de quartzo, 1800  $\mu\text{L}$  de TFK 50 mM (pH 7,0) seguido de 20  $\mu\text{L}$  da amostra (S1). Logo após, o equipamento foi zerado e adicionou-se 180  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  30% (diluído em TFK 50mM (pH 7,0) e preparado no dia da realização da análise). A absorbância diminuída de  $\text{H}_2\text{O}_2$  em 240 nm foi registrada a cada 15 segundos durante 3 minutos, utilizando o equipamento UV-Vis (Red Tibe modelo USB650 UV). A atividade da CAT foi expressa em % do controle.

#### 4.4.2.6 Determinação da atividade da enzima superóxido dismutase (SOD)

A determinação da atividade de superóxido dismutase foi realizada conforme descrito por Kostyuk e Potapovich (1989), monitorando o efeito da inibição da auto-oxidação da quercetina. Neste método, a reação consistia em TFK [25 mM] (pH 7,5), água, TEMED [0,8 mM], EDTA [0,08 mM], S1, hidróxido de sódio [10 mM] e quercetina [0,05 mM]. Logo após foi feita a primeira leitura do tempo zero ( $t_0$ ) no leitor de placas a 405 nm e 20 minutos depois a leitura do  $t_2$ . Os resultados foram expressos pela absorbância da quantidade de proteína presente na amostra de sobrenadante, calculada como porcentagem de inibição da auto-oxidação da quercetina em 50%.

#### 4.4.3 Análises Estatísticas

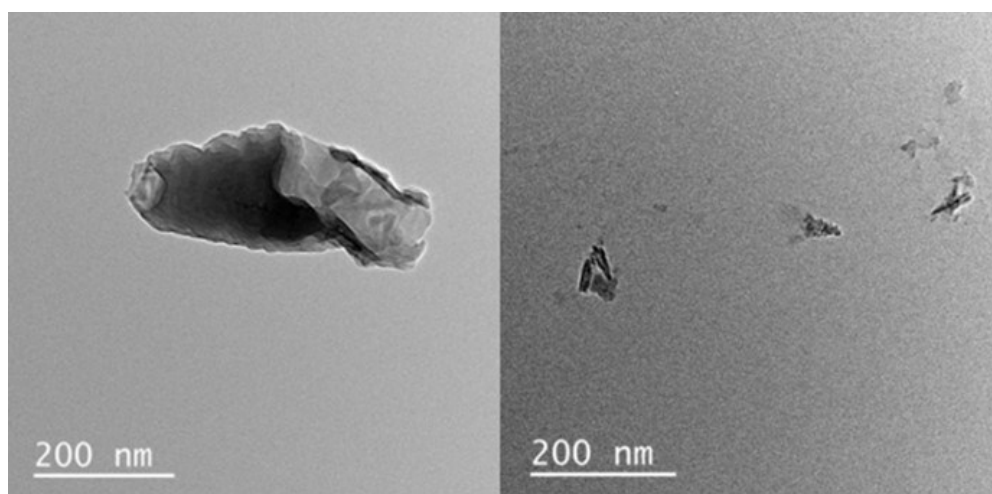
As análises estatísticas foram realizadas com o software GraphPad Prism versão 7.0, utilizando a ANOVA de uma ou duas vias a um nível de significância de 0,05. Os dados foram expressos em média  $\pm$  SEM e as análises foram realizadas em moscas suplementadas com controle (água ou etanol) e nanopartículas de berberina com concentrações (3; 10; 30 e 100  $\mu$ M).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Caracterização das Nanopartículas

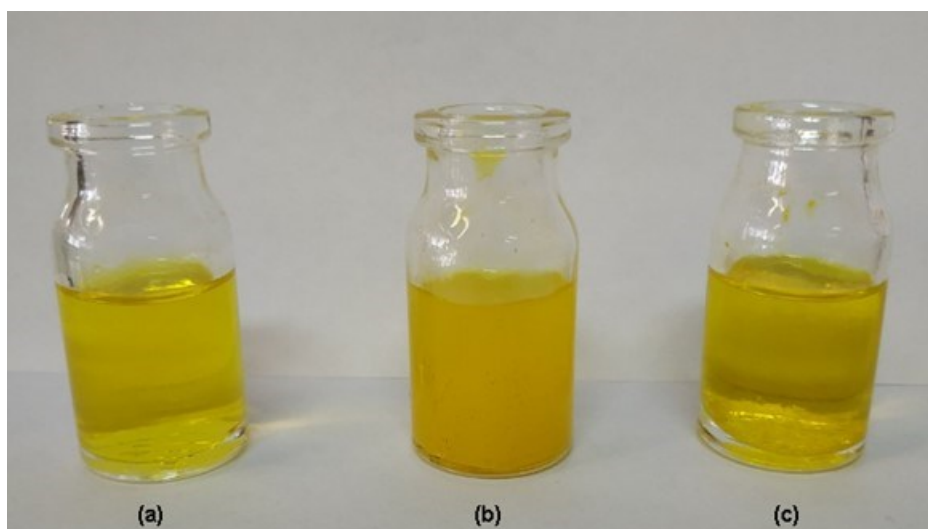
A Figura 7 apresenta imagens de nanopartículas contendo berberina obtidas por Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM). A Figura 8 apresenta as dispersões em água (a) das nanopartículas contendo berberina e (b) da berberina, assim como (c) uma solução de berberina em etanol, ressaltando que todas contêm a mesma concentração de berberina (1 mg/mL).

**Figura 7 – Micrografias das nanopartículas contendo berberina obtidas por TEM**



Fonte: Autoria própria (2020)

**Figura 8 – Dispersão aquosa (a) de nanopartículas contendo berberina; (b) de berberina; e (c) berberina solubilizada em etanol (todas na concentração de 1 mg/mL)**

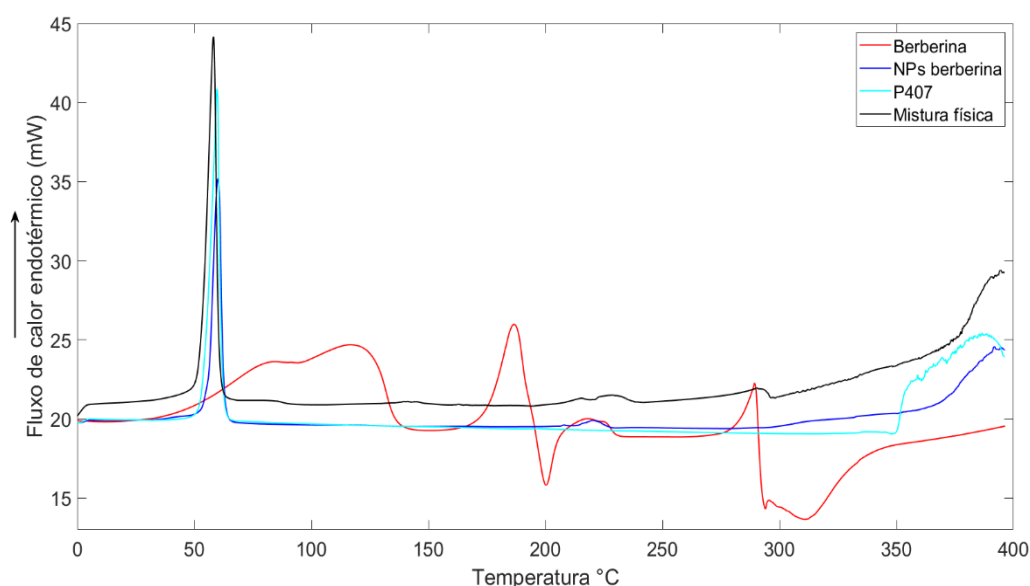


Fonte: Autoria própria (2020)

As nanopartículas apresentaram morfologia irregular e não-esférica. Silva Sá et al. (2019) obtiveram resultados semelhantes utilizando curcumina como bioativo. Na Figura 8, pode-se observar que a berberina dispersa em água (b) se apresentou turva, enquanto a dispersão sólida contendo berberina tem aspecto translúcido. Isso indica um aumento da afinidade da berberina pela água, o que é característico das dispersões sólidas (MIRANDA et al, 2020). Esse aumento da hidrofiliicidade pode estar ligada a conversão da natureza cristalina/semicristalina para a amorfa e ao aumento da área de superfície (SAHIBZADA et al., 2018). A berberina em etanol também apresentou aspecto translúcido, o que era esperado dada sua alta solubilidade em etanol.

A Figura 9 apresenta os termogramas obtidos por Calorimetria Diferencial de Varredura de berberina, nanopartículas contendo berberina (NPs-berberina), P407 e mistura física entre P407 e berberina (na mesma proporção mássica encontrada nas nanopartículas).

**Figura 9 – Termogramas obtidos por Calorimetria Diferencial de Varredura de berberina, NPs-berberina, P407 e mistura física**

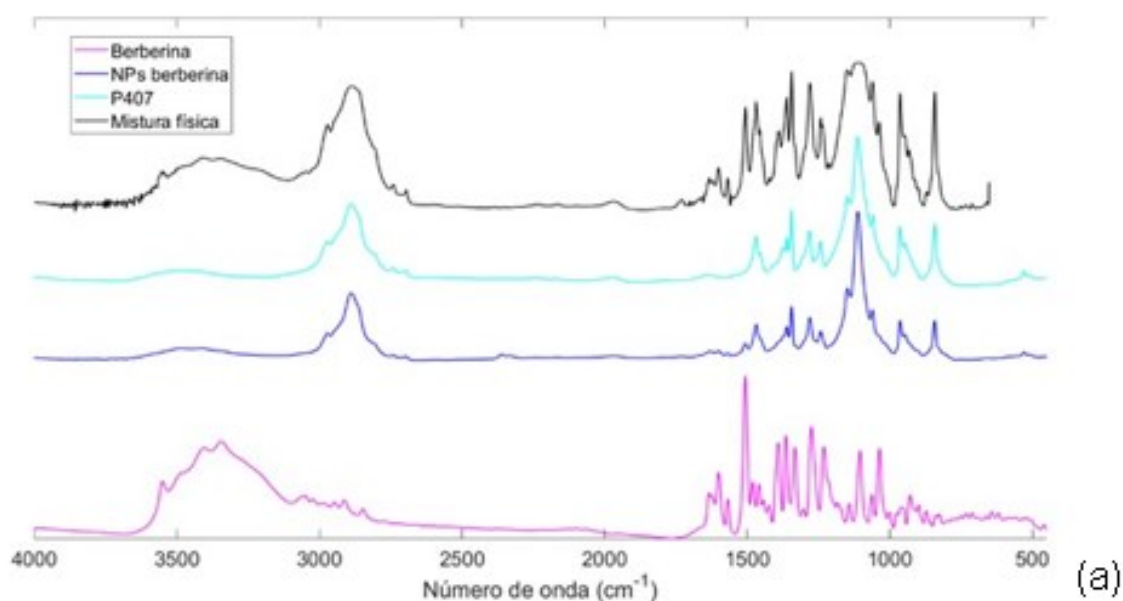


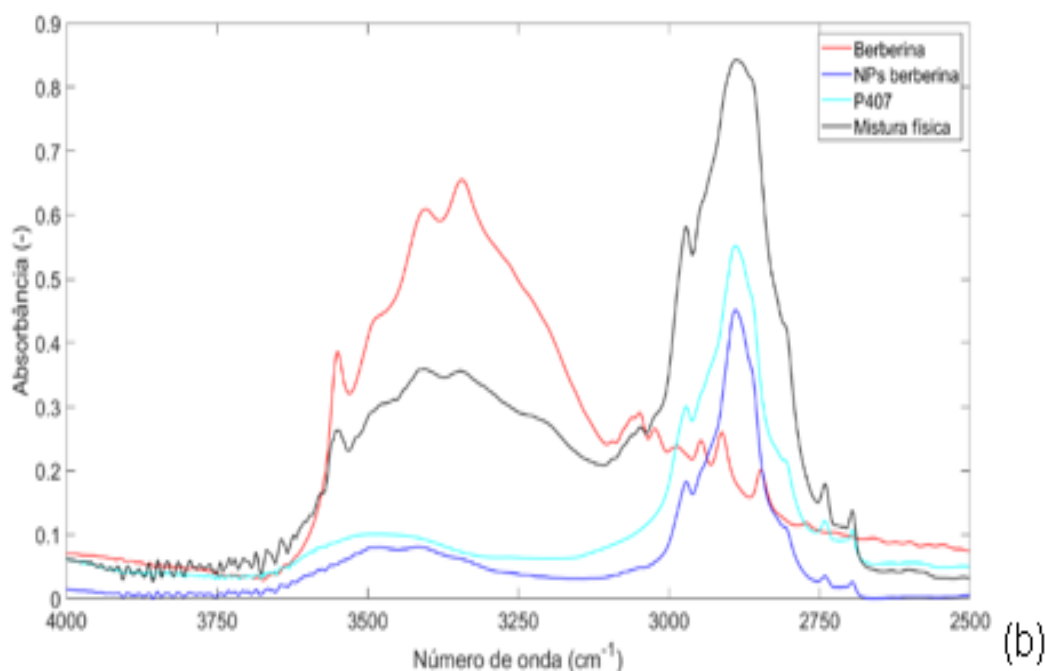
Fonte: Autoria própria (2020)

Os termogramas de DSC mostraram picos endotérmicos em torno de 59 °C, os quais estão relacionados à fusão do Poloxamer 407 (EI-BADRY et al., 2013; SILVA SÁ et al., 2019). A fusão da berberina gerou um pico endotérmico acentuado observado a cerca de 186,4 °C, próximo ao valor indicado na literatura de 187,9 °C (Li e Xu, 2010), 191,05 °C (Zhang et al., 2013) e 190 °C (Vuddanda et al., 2014). O desaparecimento do pico endotérmico característico da berberina nas nanopartículas, sugerem que a berberina foi convertida do estado de condição cristalina para o amorfo após a sua encapsulação.

Os espectros de absorção de infravermelho de berberina, P407, NPs-berberina e mistura física produzida de encapsulante e berberina estão representados na Figura 10.

**Figura 10 – Espectros na região do Infravermelho de berberina, P407, NPs-berberina e mistura física. Transmitância (a) e Absorbância (b)**

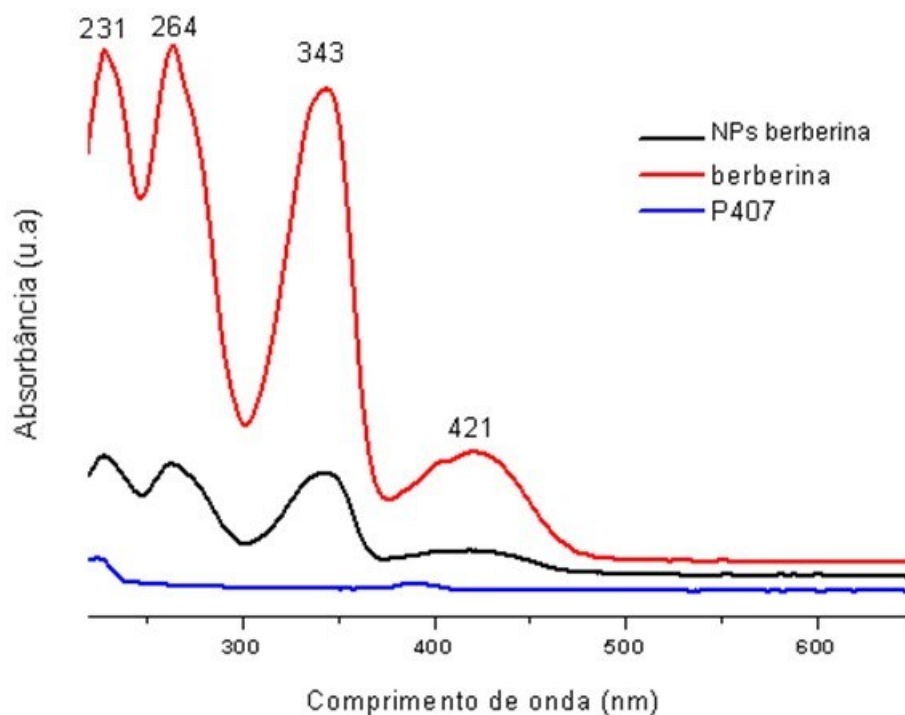




Fonte: Autoria própria (2020)

O espectro característico da berberina revelou picos em  $3300\text{ cm}^{-1}$  (alongamento OH), um pico de ligação dupla do grupamento C=N em  $1600\text{ cm}^{-1}$ , um pico principal em  $1502\text{ cm}^{-1}$  de vibrações de carbonos do anel aromático (C=C), além de um pico na região de  $2850\text{ cm}^{-1}$  característico do grupo metoxila (SOLANKI et al., 2020; VUDDANDA et al., 2014). O espectro P407 mostrou a existência de um pico de absorção principal em torno de  $2890\text{ cm}^{-1}$  para o alongamento alifático C-H, além de um pico principal observado em aproximadamente  $1100\text{ cm}^{-1}$  característico de éter aromático (C-O). O pico em  $2750\text{ cm}^{-1}$  apareceu com intensidade reduzida na mistura física, contudo ele desapareceu nas nanopartículas, sugerindo a encapsulação da berberina na matriz do Poloxamer.

A Figura 11 mostra os espectros de absorção de UV-Vis de berberina, NPs-berberina e P407.

**Figura 11 – Espectros de absorção na região do UV-Vis de berberina, NPs-berberina e P407**

Fonte: Autoria própria (2020)

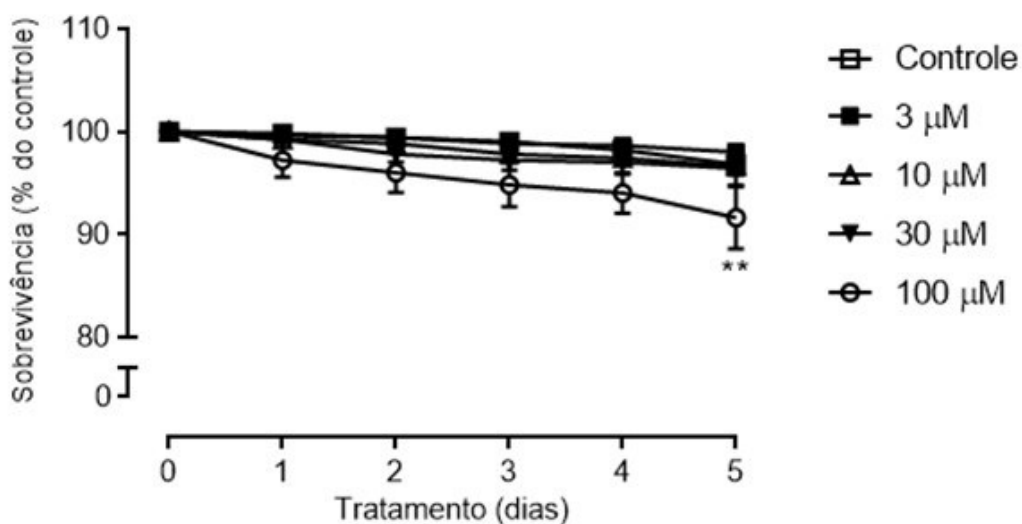
Nota-se que o espectro de berberina apresentou quatro picos de absorção, uma banda com o máximo de absorção centrado na região visível em 421 nm e três picos com comprimentos de onda de 343 nm, 264 nm e 231 nm, respectivamente. O espectro das NPs-berberina apresentou pico principal em 343 nm, enquanto que o P407 não mostrou pico significativo no espectro de UV-Vis, assim como nos resultados encontrados do estudo de Al-Obaidy, Greenway e Paunov (2019).

## 5.2 Efeito da Berberina na Taxa de Sobrevivência das *Drosophila melanogaster*

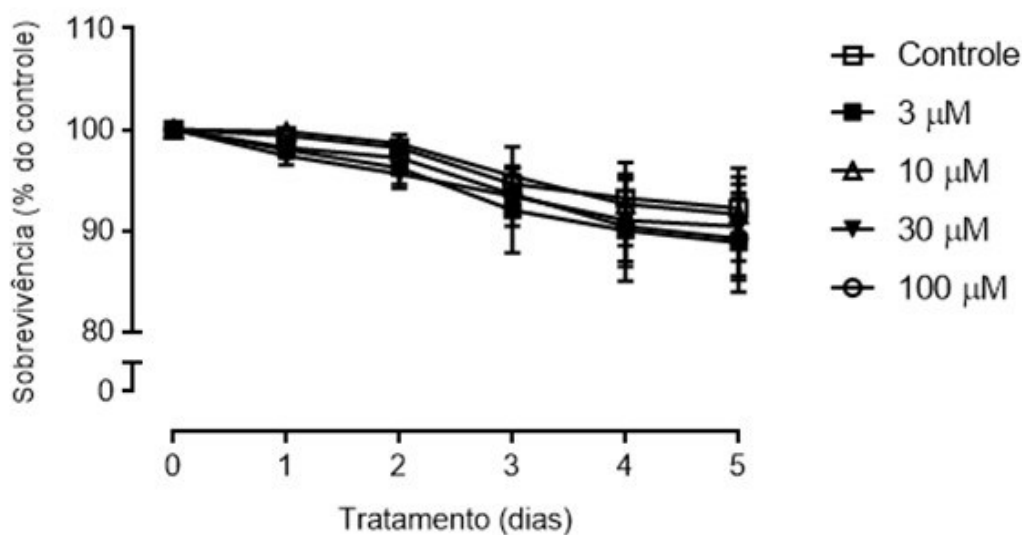
Neste estudo, foi determinado o efeito da dieta suplementada com NPs-berberina, berberina livre em água e etanol na taxa de sobrevivência das moscas. A mortalidade cumulativa no grupo controle e moscas expostas a NPs-berberina (Figura 12a), berberina livre em água (Figura 12b) e berberina livre em etanol (Figura 12c) na taxa de sobrevivência das moscas por 5 dias consecutivos é apresentada na Figura 12.



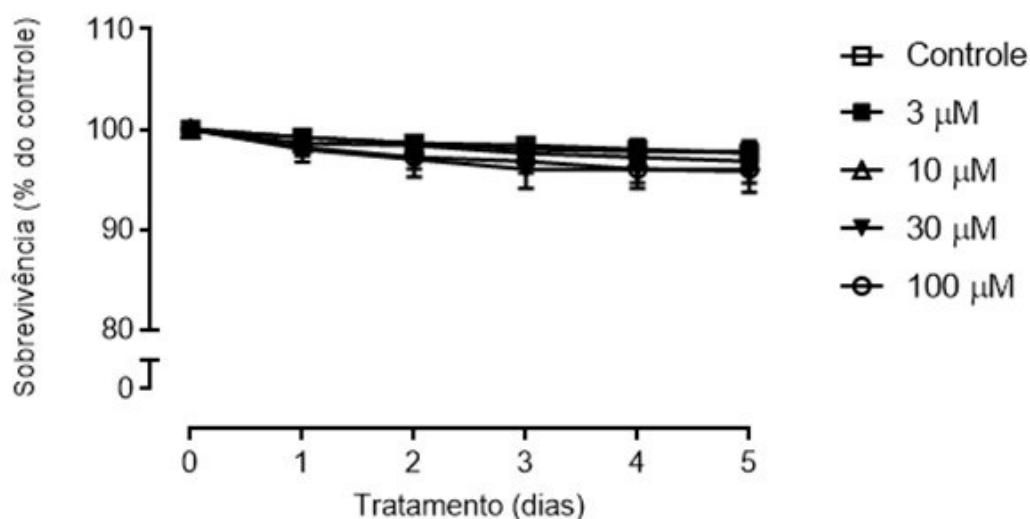
Figura 12 – Taxas de sobrevivência de moscas suplementadas com: (a) NPs-berberina, (b) Berberina livre em água e (c) Berberina livre em etanol. Os dados foram coletados a cada 24 horas para cada grupo durante 5 dias. O número de moscas sobreviventes é representado como % em relação ao controle. O número total de moscas (500 por grupo) representa a soma de cinco experimentos independentes (\*\* $p < 0,01$ ). Os valores são expressos como média  $\pm$  SEM



(a) NPs-berberina



(b) Berberina livre em água



(c) Berberina livre em etanol

Fonte: Autoria própria (2020)

Não houve mortalidade significativa em moscas tratadas com berberina livre água (Figura 12b) e livre em etanol (Figura 12c) com as concentrações de 3; 10; 30; e 100 µM, do dia 1 até o final do período experimental (dia 5) quando comparadas com o controle, sendo >90% a taxa de sobrevivência. Entretanto, as moscas tratadas com as concentrações de 3 µM e 100 µM de berberina em água foram as únicas que apontaram taxas de sobrevivência menores que 90% no quinto dia de experimento com 88,8% e 89,2%, respectivamente, em relação ao controle.

As NPs-berberina (Figura 12a) com concentrações 3, 10 e 30 µM não apresentaram mortalidade significativa durante os 5 dias de experimento. No entanto, a taxa de sobrevivência de moscas suplementadas com 100 µM apresentou uma diminuição significativa (\*\*p<0,01) em relação ao controle, ainda que a sobrevivência dessas moscas apresentou ser maior que 90%, com uma taxa de 91,6% no quinto dia. O resultado levanta uma hipótese de que caso o experimento fosse avaliado em mais dias, a taxa de sobrevivência das moscas na concentração ≥100 µM de nanopartículas de P407 contendo berberina poderia diminuir ainda mais. O estudo de Habtemariam (2020) mostra que maiores efeitos da berberina são denotados de 10 a 100 µM na maioria das células.

Resultados direcionados ao efeito da berberina no desenvolvimento de *Drosophila melanogaster* durante o mesmo período em dias e nas concentrações utilizadas neste estudo não foram encontrados na literatura até o presente

momento. Portanto, os resultados obtidos neste trabalho foram avaliados a partir de dados obtidos em estudos sobre o efeito da berberina em diferentes organismos na literatura.

O estudo de Chu et al. (2014) relatou que 50% dos camundongos estudados sem tratamento com berberina morreram no final do 8º dia (período do teste) após a infecção com *Salmonella typhimurium*. Em contrapartida, depois do tratamento com 10, 20, 30 e 40 mg/kg de berberina, 60, 60, 70 e 90%, respectivamente, dos camundongos infectados sobreviveram até o 8º dia.

Moscas do tipo selvagem Oregon de *Drosophila melanogaster* foram estudadas por Navrotskaya et al. (2014). O estudo revelou que a berberina amplia o tempo de vida das moscas mantidas em alta temperatura, prolongando a expectativa de vida em 46% em comparação com as moscas controle sem tratamento com berberina mantidas a 28 °C. A ação da BBR no estudo relatado anteriormente se deu no aumento da capacidade das moscas de resistirem ao estresse causado pela alta temperatura, notando seu potencial antioxidante.

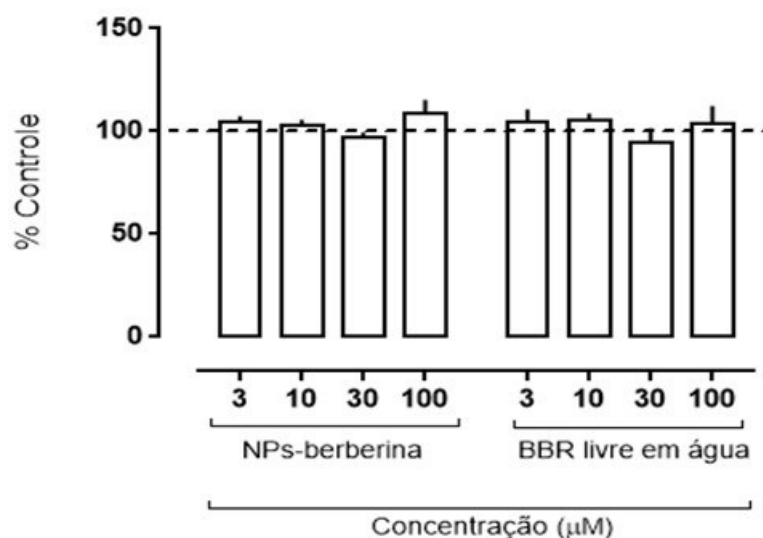
O estudo de Atici; Altun Çolak; Ersöz (2018) avaliou os efeitos tóxicos da bleomicina – BLM no número de descendentes (filhos) e na taxa de sobrevivência de moscas da fruta, bem como o papel protetor do extrato de frutas *Berberis crataegina* DC. – BCE sobre tais efeitos. Para indivíduos do sexo feminino e masculino tratados com BLM + BCE, o número de filhos se aproxima do controle; e ambos os grupos tratados apenas com BCE, o número total de descendentes é maior do que o controle, mostrando que a berberina também possui efeito protetor.

### **5.3 Ensaio *ex vivo* em *Drosophila melanogaster***

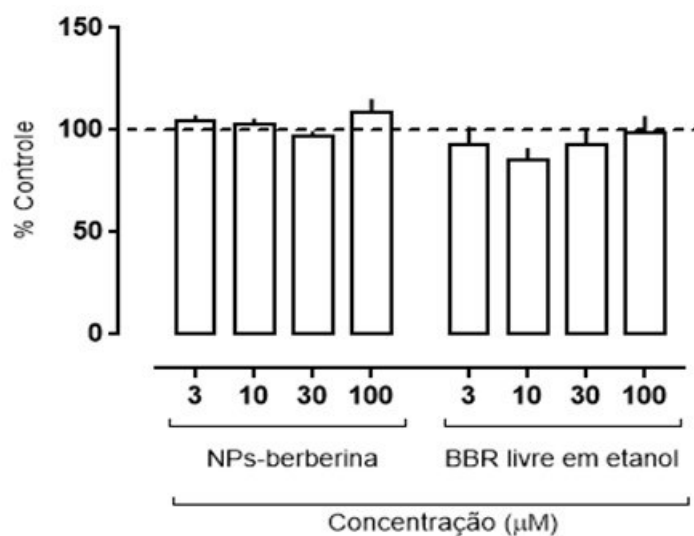
#### **5.3.1 Determinação das atividades da AChE e BChE**

A Figura 13 mostra os resultados da atividade da AChE (a) comparação de NPs-berberina com berberina livre solubilizada em água e (b) comparação de NPs-berberina com berberina livre solubilizada em etanol no tecido de *Drosophila melanogaster*.

Figura 13 – (a) Efeitos das NPs-berberina e da berberina livre em água na atividade da AChE e (b) Efeitos das NPs-berberina e da berberina livre em etanol na atividade da AChE no tecido de *Drosophila melanogaster*. Os valores foram expressos em média  $\pm$  SEM (n = 5 por grupo). Não houve significância detectada pela Análise de Variância Unidirecional (ANOVA) seguida do teste de Tukey em comparação ao controle



(a)

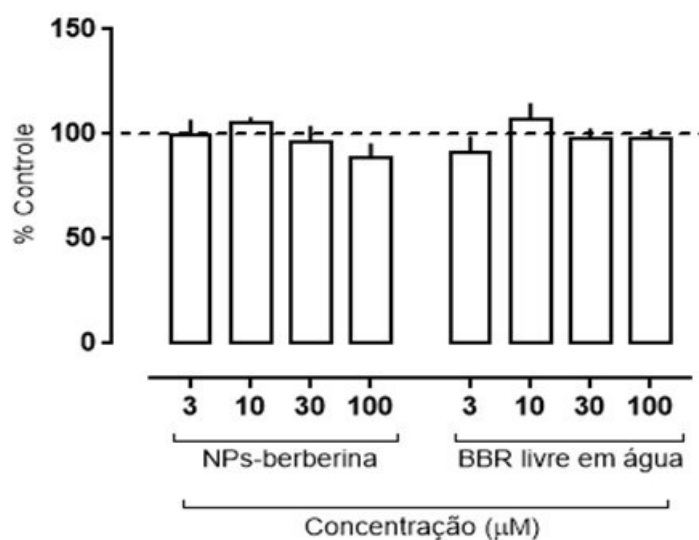


(b)

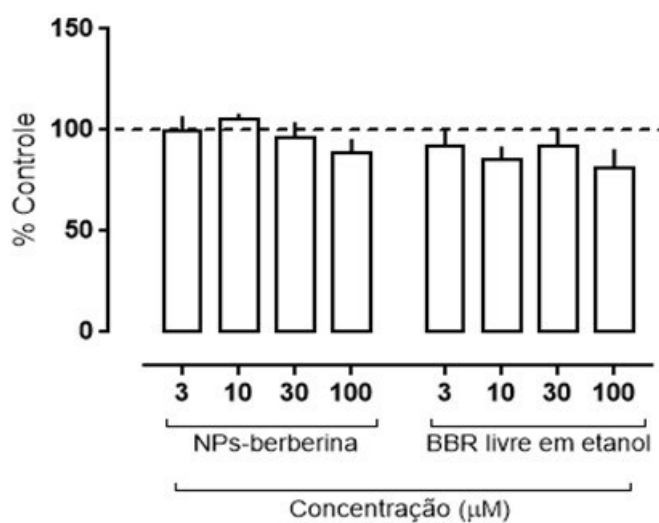
Fonte: Autoria própria (2020)

A Figura 14 mostra os resultados da atividade da BChE (a) comparação de NPs-berberina com berberina livre solubilizada em água e (b) comparação de NPs-berberina com berberina livre solubilizada em etanol no tecido de *Drosophila melanogaster*.

Figura 14 – (a) Efeitos das NPs-berberina e da berberina livre em água na atividade da BChE e (b) Efeitos das NPs-berberina e da berberina livre em etanol na atividade da BChE no tecido de *Drosophila melanogaster*. Os valores foram expressos em média  $\pm$  SEM (n = 5 por grupo). Não houve significância detectada pela Análise de Variância Unidirecional (ANOVA) seguida do teste de Tukey em comparação ao controle



(a)



(b)

Fonte: Autoria própria (2020)

Pode-se observar pelas Figuras 13a e 13b para a atividade da AChE que não houve mudanças estatisticamente significativas em relação ao controle. Isso indica que a berberina protege contra a inibição brusca da atividade da AChE e além disso, neutraliza a alta elevação da atividade da enzima em ensaio *ex vivo* de *Drosophila melanogaster*, podendo ser, portanto, uma fonte fitoquímica útil para o desenvolvimento de novas terapias para o controle da neurodegeneração.

Halmenschelager; Da Rocha (2019) e Abolaji et al. (2020) em seus estudos relatam que tanto o aumento quanto a diminuição da AChE podem trazer consequências tóxicas nas moscas, prejudicando sua locomoção dentre outros comportamentos. Como observado, nas nanopartículas carregadas de berberina com as concentrações de 3, 10, 30 e 100  $\mu\text{M}$  houve um aumento na atividade da AChE na faixa de 4,68%, aumento de 3%, diminuição de 2,83% e aumento de 9%, respectivamente.

Na Figura 13b, não houve diferença significativa em relação ao controle. No entanto, o resultado sugere uma redução da atividade da AChE nas concentrações utilizadas da berberina livre em etanol comparadas ao controle, com reduções de 6,91%, 14,51%, 7,12% e 1,31%, respectivamente. No estudo de Patil et al. (2015), os autores realizaram um tratamento crônico em ratos tratados com etanol e adicionaram o composto berberina, obtendo um avanço no desempenho cognitivo e uma redução no estresse oxidativo e na atividade da colinesterase. Ou seja, a berberina desempenhou um papel protetor contra a disfunção cognitiva induzida pelo etanol na melhora da memória dos ratos estudados.

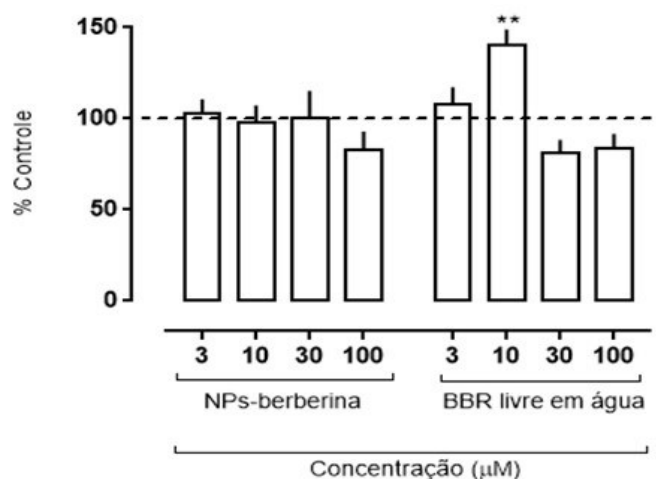
Observa-se pelas Figuras 14a e 14b para a atividade da BChE que não houve mudanças estatisticamente significativas em relação ao controle. Os resultados demonstraram que houve uma inter-relação dos níveis de AChE e BChE no tratamento com berberina em modelo *ex vivo* no tecido de *Drosophila melanogaster*, já que poucas diferenças entre os gráficos das enzimas puderam ser constatadas.

Níveis irregulares de AChE e BChE podem desempenhar fatores fundamentais na patogênese de distúrbios em doenças neurodegenerativas, como a doença de Alzheimer (DA). O estudo de Mushtaq et al. (2014) revela que a DA ocorre quando há um desequilíbrio entre as colinesterases no cérebro, causando uma deficiência no neurotransmissor acetilcolina. Os níveis de AChE na área cerebral diminuem, ao passo que os de BChE aumentam na DA ocasionando a desregulação do equilíbrio. Neste trabalho, a berberina desempenhou um papel de equilíbrio das duas enzimas nos tecidos cerebrais de *Dm*, indicando que pode ser um composto com alto potencial terapêutico no tratamento contra a DA.

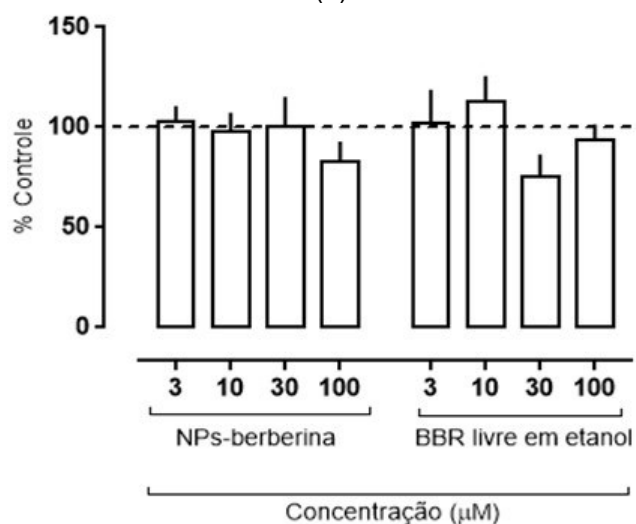
### 5.3.2 Determinação da atividade de Tióis Totais

As Figuras 15a e 15b apresentam os resultados da atividade de tióis totais de berberina solubilizada em água e etanol com NPs-berberina, respectivamente.

**Figura 15 – (a) Efeitos das NPs-berberina e da berberina livre em água na atividade de tióis totais. (b) Efeitos das NPs-berberina e da berberina livre em etanol na atividade de tióis totais. Os valores foram expressos em média  $\pm$  SEM (n = 5 por grupo). A significância foi determinada pela Análise de Variância Unidirecional (ANOVA) seguida do teste de Tukey (\*\* $p < 0,01$ ) em comparação ao controle**



(a)



(b)

**Fonte: Autoria própria (2020)**

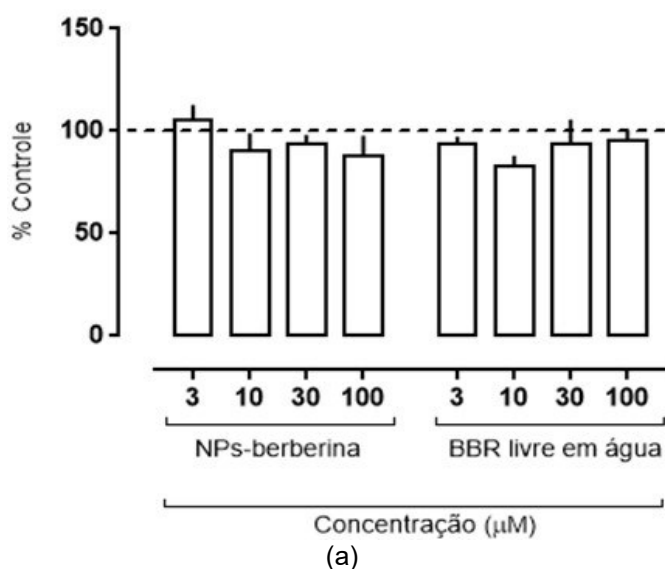
Somente na berberina livre em água houve um aumento significativo ( $p < 0,01$ ) da atividade de tióis totais na concentração de 10 µM em relação ao controle, como mostra a Figura 15a. NPs-berberina e berberina livre em etanol não apresentaram efeito significativo.

A glutathione é uma enzima que regularmente diminui durante o estresse oxidativo e, após a aplicação da berberina, o nível de tiol total aumenta, o que destaca o estudo de Xu et al. (2017). No estudo de Sadeghnia et al. (2017), a exposição de células PC12 e N2a, células utilizadas como sistema de modelo neuronal para investigação do dano oxidativo causado pelo glutamato, resultou em uma diminuição significativa da porcentagem de glutathione em comparação com a célula controle. Após o uso da berberina, observaram aumentos significativos do nível de glutathione em relação às células afetadas com glutamato.

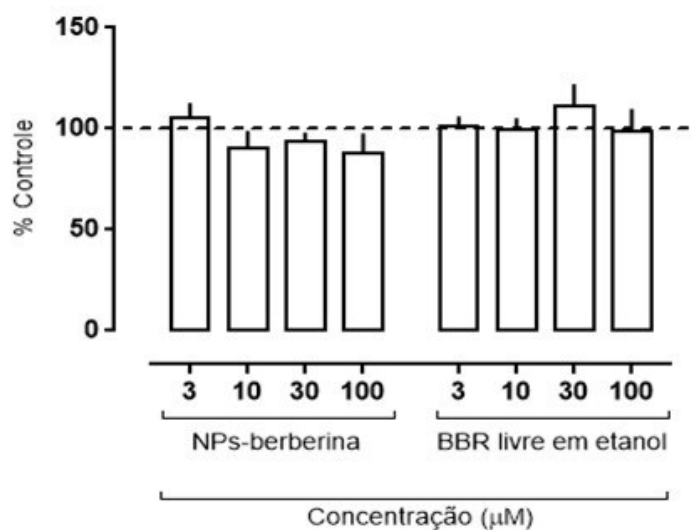
### 5.3.3 Determinação das atividades das enzimas antioxidantes CAT e SOD

As atividades das enzimas CAT e SOD são mostradas a seguir nas Figuras 16 (a) e (b) e Figuras 17 (a) e (b), respectivamente. As Figuras (a) e (b) apresentam os resultados da berberina solubilizada em água e etanol comparadas com NPs-berberina, respectivamente.

**Figura 16 – Os gráficos acima representam a atividade da catalase. (a) NPs-berberina e berberina livre em água; e (b) NPs-berberina e berberina em etanol. Os resultados são mostrados como média  $\pm$  SEM de 5 experimentos independentes**



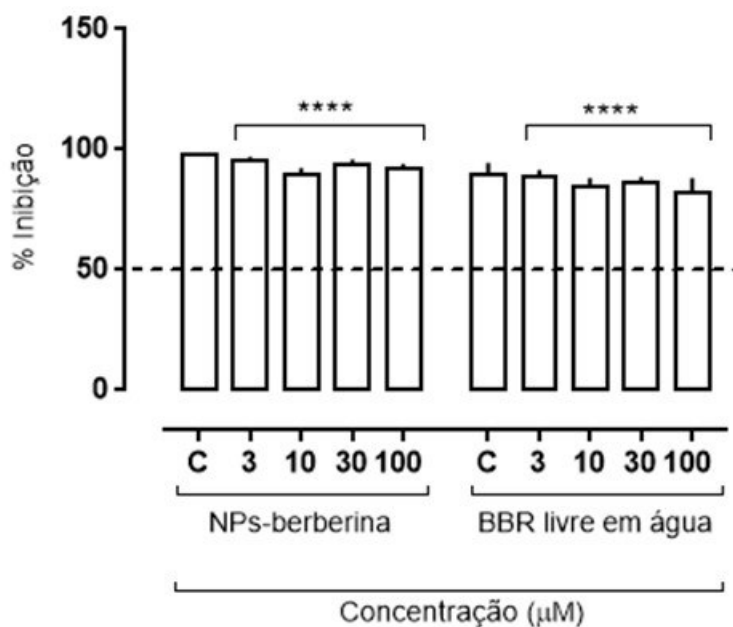




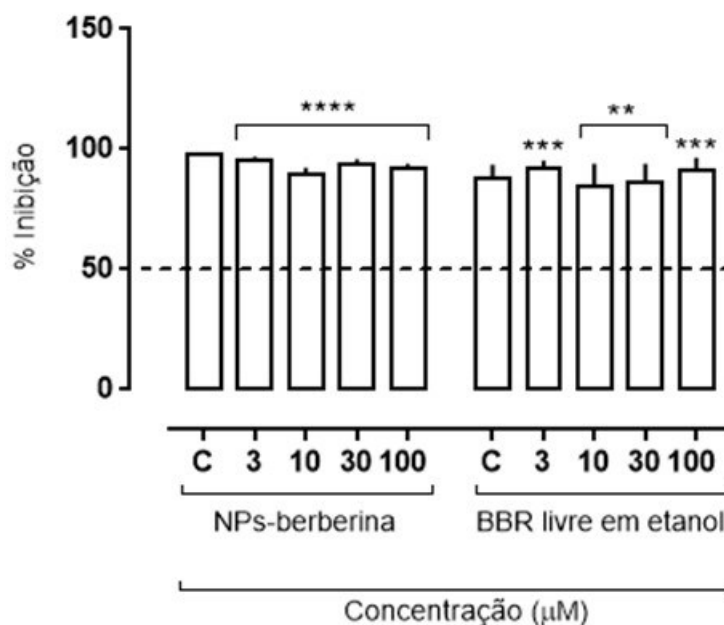
(b)

Fonte: Autoria própria (2020)

Figura 17 – Os gráficos acima representam a inibição induzida da auto-oxidação da quercetina em 50% na atividade da SOD. (a) NPs-berberina e berberina livre em água; e (b) NPs-berberina e berberina em etanol. Os resultados são mostrados como média  $\pm$  SEM de 5 experimentos independentes e \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  e \*\*\*\* $p < 0,0001$  denotam diferença significativa em comparação com a porcentagem de inibição



(a)



(b)

Fonte: Autoria própria (2020)

Podemos observar na Figura 16a que nas concentrações (10; 30 e 100 μM) de NPs-berberina e em todas as concentrações de berberina livre em água, houve uma diminuição no nível da CAT em relação ao controle, porém, sem possuir efeito estatisticamente significativo. A atividade da CAT tanto nas NPs-berberina quanto nas berberinas livres em água e etanol, não apresentou alterações significativas em nenhuma das concentrações testadas em relação ao controle, ou seja, a atividade da enzima não aumentou e nem diminuiu estatisticamente.

O resultado da CAT pode sugerir que a berberina teve um papel de conter uma modulação da enzima nas concentrações de 10; 30 e 100 μM das NPs-berberina e em todas as concentrações da berberina livre em água, o que evitou um resultado de estresse oxidativo, indicando que o fármaco estudado pode contribuir para o equilíbrio oxidante-antioxidante celular.

Podemos observar nas Figuras 17a e 17b que todas as concentrações inibiram a oxidação da quercetina, portanto, a SOD conseguiu evitar a auto-oxidação da mesma. A berberina melhorou significativamente a atividade da SOD em todas as concentrações testadas.

A SOD é outro antioxidante que constantemente durante o estresse oxidativo diminui sua atividade, no entanto, com a presença da berberina o nível da enzima

aumentou, assim como foi destacado no estudo de Xu et al. (2017). Outros trabalhos destacaram também a utilização da berberina com o aumento da atividade da superóxido dismutase. Abd El-Wahab et al. (2013), observaram que o extrato etanólico de *Berberis vulgaris* aumenta a atividade da SOD em avaliação biológica *in vitro* e Zhou & Zhou (2011) relataram que houve aumento do nível da SOD em ratos diabéticos tratados com berberina. O estudo de Li et al. (2016) indica que a berberina possui efeitos protetores e que tais efeitos podem ter relação com a diminuição do estresse oxidativo. Os resultados também confirmaram seu efeito neuroprotetor através da manutenção do equilíbrio oxidativo em células de organismo biológico que não foram induzidas por material neurotóxico, como mercúrio (Abdel Moneim, 2015) e mistura de materiais pesados como alumínio, cádmio e flúor (Hussien et al., 2018), dentre outros.

A relação SOD/CAT das enzimas foi dada como um índice do estado oxidativo por Palomero et al. (2001). O aumento na atividade da CAT com a diminuição na atividade da SOD, pode causar um desequilíbrio na geração fisiológica das EROs na maioria das regiões cerebrais, revela o estudo de Konrath et al. (2012). Assim como, o aumento do nível da atividade da SOD leva a um aumento na produção de  $H_2O_2$ , que juntamente acompanhado com a diminuição da CAT leva a um acúmulo de  $H_2O_2$ , que resulta em estresse oxidativo (MANUAL KOLLARETH et al., 2017). Zhang et al. (2016) relatam que as EROs para um funcionamento normal, encontram-se em equilíbrio com os antioxidantes bioquímicos nas células aeróbicas.

Portanto, os resultados demonstraram que a utilização da berberina ocasionou um equilíbrio oxidativo através das enzimas no tecido das moscas, já que houve aumento significativo na atividade da SOD e nenhuma alteração estatisticamente significativa na atividade da CAT, evitando estresse oxidativo.

## 6 CONCLUSÃO

Dispersões sólidas contendo berberina e Poloxamer 407 foram obtidas e avaliadas em ensaios *in vivo* utilizando *Drosophila melanogaster* como modelo. A dispersão sólida pôde ser experimentalmente dispersa em água gerando um sistema translúcido, o que indica o aumento da afinidade da berberina pela água. A formação da dispersão sólida foi corroborada pelas análises térmica e espectroscópicas.

A dispersão sólida contendo berberina, quando utilizada nas concentrações de 3, 10, e 30  $\mu\text{M}$  não provocaram mortalidade significativa para as *Drosophila melanogasters* mediante o teste *in vivo*, o que sugere não apresentarem efeito neurotóxico.

A inibição das enzimas acetilcolinesterase (AChE) e butirilcolinesterase (BChE) pareceu ser controlada pela berberina, conforme evidenciado nos experimentos *ex vivo*. A berberina é reconhecida por exibir efeito antioxidante e atividade inibidora das colinesterases. No entanto, até o presente momento os dados sobre a influência da berberina na inibição das atividades da AChE e BChE em ensaios *ex vivo* no tecido de *Drosophila melanogaster* são escassos. Essas descobertas evidenciam sobre a base molecular dos efeitos inibitórios da berberina contra as enzimas colinérgicas implicadas na patogênese da DA e serão úteis para o projeto de drogas anti-DA à base de berberina.

A berberina aumentou a atividade da enzima superóxido dismutase (SOD), manteve em equilíbrio a atividade da enzima catalase, aumentou a concentração de grupos tióis totais na concentração de 10  $\mu\text{M}$ , mantendo-se em equilíbrio nas demais concentrações. De acordo com esses resultados, a berberina pode exercer efeito oxidante-antioxidante, protegendo contra o estresse oxidativo e mantendo o equilíbrio celular nos tecidos do modelo biológico.

Pode-se concluir que a berberina possui potencial protetor, antioxidante e não tóxico nas condições avaliadas. Este estudo reforça também a utilização do modelo de *Drosophila melanogaster* em estudos toxicológicos e destaca a berberina como um importante alvo na busca de compostos com potencial terapêutico contra doenças neurodegenerativas, como a doença de Alzheimer.

## REFERÊNCIAS

ABD EL-WAHAB, A. E. et al. *In vitro* biological assessment of *Berberis vulgaris* and its active constituent, berberine: Antioxidants, anti-acetylcholinesterase, anti-diabetic and anticancer effects. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 13, n. 218, 2013.

ABDEL MONEIM, A. E. The neuroprotective effect of berberine in mercury-induced neurotoxicity in rats. **Metabolic Brain Disease**, v. 30, n. 4, p. 935–942, 2015.

ABOLAJI, A. O. et al. Ovotoxicants 4-vinylcyclohexene 1,2-monoepoxide and 4-vinylcyclohexene diepoxide disrupt redox status and modify different electrophile sensitive target enzymes and genes in *Drosophila melanogaster*. **Redox Biology**, v. 5, p. 328–339, 2015.

ABOLAJI, A. O. et al. Dietary consumption of monosodium L-glutamate induces adaptive response and reduction in the life span of *Drosophila melanogaster*. **Cell Biochemistry and Function**, v. 35, n. 3, p. 164–170, 2017.

ABOLAJI, A. O. et al. Curcumin attenuates copper-induced oxidative stress and neurotoxicity in *Drosophila melanogaster*. **Toxicology Reports**, v. 7, p. 261–268, 2020.

AEBI, H. Catalase *in Vitro*. **Methods in Enzymology**, v. 105, n. C, p. 121–126, 1984.

AGUNLOYE, O. M.; OBOH, G.; FALADE, A. O. Pleurotus ostreatus and Lentinus subnudus supplemented diets restore altered acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase activities and improve antioxidant status in transgenic *Drosophila melanogaster* model. **Journal of Dietary Supplements**, p. 1–15, 2020.

AHMED, T. et al. Berberine and neurodegeneration: A review of literature. **Pharmacological Reports**, v. 67, n. 5, p. 970–979, 2015.

AL-OBAIDY, S. S. M.; GREENWAY, G. M.; PAUNOV, V. N. Dual-functionalised shellac nanocarriers give a super-boost of the antimicrobial action of berberine. **Nanoscale Advances**, v. 1, p. 858–872, 2019.

ALIAGA, M. E. et al. Redox-implications associated with the formation of complexes between copper ions and reduced or oxidized glutathione. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 154, p. 78–88, 2016.

ALMEIDA, M. et al. Evaluation of the: *In vivo* acute antiinflammatory response of curcumin-loaded nanoparticles. **Food and Function**, v. 9, p. 440–449, 2018.

ALVES, E. M.; NEPOMUCENO, J. C. Evaluation of the anticarcinogenic effect of the latex of “avelós” (*Euphorbia tirucalli*), through the test for detection of tumor clones (warts) in *Drosophila melanogaster*. **Scielo**, v. 9, n. 2, p. 125–140, 2011.

ANDERSEN, M. L.; WINTER, L. M. F. Animal models in biological and biomedical research – experimental and ethical concerns. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 91, p. 1–14, 2017.

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

ARAUJO, S. M. et al. Effectiveness of  $\gamma$ -oryzanol in reducing neuromotor deficits, dopamine depletion and oxidative stress in a *Drosophila melanogaster* model of Parkinson's disease induced by rotenone. **NeuroToxicology**, v. 51, p. 96–105, 2015.

ASSIS, L. et al. Review : Characteristics of nanoparticles and their potential applications in foods. **Brazilian Journal of Food Technol**, v. 15, n. 2, p. 99–109, 2012.

ATICI, T.; ALTUN ÇOLAK, D.; ERSÖZ, Ç. Protective effects of *Berberis crataegina* DC. (Ranunculales: Berberidaceae) extract on Bleomycin-induced toxicity in fruit flies (Diptera: Drosophilidae). **Revista de la Sociedad Entomológica Argentina**, v. 77, n. 4, 2018.

BAENAS, N.; WAGNER, A. E. *Drosophila melanogaster* as an alternative model organism in nutrigenomics. **Genes and Nutrition**, v. 14, n. 1, p. 1–11, 2019.

BAFANA, A. et al. The basic and applied aspects of superoxide dismutase. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 68, n. 2, p. 129–138, 2011.

BAG, J.; MISHRA, M. Biochemical Assays to Detect the Antioxidant Level in *Drosophila melanogaster*. In: **Fundamental Approaches to Screen Abnormalities in Drosophila**. 2020. p. 151–168.

BAJPAI, V. K. et al. Prospects of using nanotechnology for food preservation, safety, and security. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 26, n. 4, p. 1201–1214, 2018.

BARBOSA, T. N. R. M.; FERNANDES, D. C. Bioactive compounds and cardiovascular diseases: reviewing the scientific evidence. **Estudos, vida e saúde**, v. 41, n. 2, p. 181–192, 2014.

BAZANA, M. T. et al. Lycopene nanoencapsulation in food. **Ciência e Natura**, v. 37, p. 38–48, 2015.

BAZANA, M. T.; CODEVILLA, C. F.; MENEZES, C. R. Nanoencapsulation of bioactive compounds: challenges and perspectives. **Current Opinion in Food Science**, v. 26, p. 47–56, 2019.

CALAP-QUINTANA, P. et al. *Drosophila melanogaster* models of metal-related human diseases and metal toxicity. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 7, p. 1456, 2017.

CHU, M. et al. Role of berberine in anti-bacterial as a high-affinity LPS antagonist binding to TLR4/MD-2 receptor. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 14, n. 89, 2014.

CHYB, S.; GOMPEL, N. **D. melanogaster subgroup species**. Atlas of *Drosophila* Morphology: Wild-type and Classical Mutants, 2013. p.209-220.

CODEVILLA, C. F. et al. Nanostructures containing bioactive compounds extracted from plants. **Ciência e Natura**, v. 37, n. 5, p. 142–151, 2015.

DI SIA, P. Nanotechnology Among Innovation, Health and Risks. **Procedia - Social and Behavioral Sciences**, v. 237, p. 1076–1080, 2017.

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

DORAN, M. L. et al. Metabolomic analysis of oxidative stress: Superoxide dismutase mutation and paraquat induced stress in *Drosophila melanogaster*. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 113, p. 323–334, 2017.

EI-BADRY, M. et al. Performance of poloxamer 407 as hydrophilic carrier on the binary mixtures with nimesulide. **Farmacia**, v. 61, n. 6, p. 1137–1150, 2013.

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

ELLMAN, G. L. et al. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical Pharmacology**, v. 7, n. 2, p. 88–95, 1961.

FAN, D. et al. Combating Neurodegenerative Diseases with the Plant Alkaloid Berberine: Molecular Mechanisms and Therapeutic Potential. **Current Neuropharmacology**, v. 17, n. 6, p. 563–579, 2019.

FORTUNATO, W. S. L.; SIQUEIRA, J. C. .; FILHO, A. S. C. **Use of nanoencapsulation in bioactive compounds: a literature review**. In: ANAIS JORNADA DE INOVAÇÃO E PESQUISA, 2017, Recife. **Anais...Recife: Faculdade São Miguel**, 2017, p. 92.

FRIZON, F. et al. Dissolution rate enhancement of loratadine in polyvinylpyrrolidone K-30 solid dispersions by solvent methods. **Powder Technology**, v. 235, p. 532–539, 2013.

GARCIA-GARCIA, A. et al. Thiol-redox signaling, dopaminergic cell death, and Parkinson's disease. **Antioxidants and Redox Signaling**, v. 17, n. 12, p. 1764–1784, 2012.

GHARSALLAOUI, A. et al. Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: An overview. **Food Research International**, v. 40, n. 9, p. 1107–1121, 2007.

GUPTA, P. K. **Fundamentals of Toxicology: Essential Concepts and Applications**. 2016. p.73-85.

HABTEMARIAM, S. Recent advances in berberine inspired anticancer approaches: From drug combination to novel formulation technology and derivatization. **Molecules**, v. 25, n. 6, p. 1426, 2020.

HADWAN, M. H.; ALI, S. KADHUM. New spectrophotometric assay for assessments of catalase activity in biological samples. **Analytical Biochemistry**, v. 542, p. 29–33, 2018.

HALMENSCHLAGER, P. T.; DA ROCHA, J. B. T. Biochemical CuSO<sub>4</sub> Toxicity in *Drosophila melanogaster* Depends on Sex and Developmental Stage of Exposure. **Biological Trace Element Research**, v. 189, n. 2, p. 574–585, 2019.

HE, X.; HWANG, H. M. Nanotechnology in food science: Functionality, applicability,



and safety assessment. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 24, n. 4, p. 671–681, 2016.

HENKEL, R.; SAMANTA, L.; AGARWAL, A. **Oxidants, antioxidants and impact of the oxidative status in male reproduction**. 2018. p. 1-298.

HUANG, L. et al. Synthesis, biological evaluation, and molecular modeling of berberine derivatives as potent acetylcholinesterase inhibitors. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 18, n. 3, p. 1244–1251, 2010.

HUANG, L. et al. Inhibition of cholinesterase activity and amyloid aggregation by berberine-phenyl-benzoheterocyclic and tacrine-phenyl-benzoheterocyclic hybrids. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 20, n. 9, p. 3038–3048, 2012.

HUSSIEN, H. M. et al. Neuroprotective effect of berberine against environmental heavy metals-induced neurotoxicity and Alzheimer's-like disease in rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 111, p. 432–444, 2018.

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

JIANG, W. X.; LI, S. H.; LI, X. J. Therapeutic potential of berberine against neurodegenerative diseases. **Science China Life Sciences**, v. 58, n. 6, p. 564–569, 2015.

JUNG, H. A. et al. Inhibitory activities of the alkaloids from *Coptidis Rhizoma* against aldose reductase. **Archives of Pharmacal Research**, v. 31, n. 11, p. 1405–1412, 2008.

KAUR, K. et al. Identification and molecular characterization of two acetylcholinesterases from the salmon louse, *Lepeophtheirus salmonis*. **PLoS ONE**, v. 10, n. 5, 2015.

KHORASANI, S.; DANAEI, M.; MOZAFARI, M. R. Nanoliposome technology for the food and nutraceutical industries. **Trends in Food Science and Technology**, v. 79, p. 106–115, 2018.

KIM, W. et al. Pharmacogenetic regulation of acetylcholinesterase activity in *Drosophila* reveals the regulatory mechanisms of AChE inhibitors in synaptic plasticity. **Neurochemical Research**, v. 36, p. 879–893, 2011.

KONRATH, E. L. et al. Investigation of the in vitro and ex vivo acetylcholinesterase and antioxidant activities of traditionally used Lycopodium species from South America on alkaloid extracts. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 139, n. 1, p. 58–67, 2012.

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.

KULKARNI, S. K.; DHIR, A. Berberine: A plant alkaloid with therapeutic potential for central nervous system disorders. **Phytotherapy Research**, v. 24, n. 3, p. 317–324, 2010.

KUMAR, P. et al. Nanotechnology and its challenges in the food sector: a review. **Materials Today Chemistry**, v. 17, 2020.

LAZZARETTI, L. L.; HUPFFER, H. M. Nanotechnology: Science's Look at the Toxicity and Potential Risks of These Products. **Revista Conhecimento Online**, v. 3, p. 79–100, 2018.

LI, H. et al. Berberine activates peroxisome proliferator-activated receptor gamma to increase atherosclerotic plaque stability in Apoe<sup>-/-</sup> mice with hyperhomocysteinemia. **Journal of Diabetes Investigation**, v. 7, n. 6, p. 824–832, 2016.

LI, N.; XU, L. Thermal analysis of  $\beta$ -cyclodextrin/Berberine chloride inclusion compounds. **Thermochemica Acta**, v. 499, n. 1–2, p. 166–170, 2010.

LIU, C. S. et al. Research progress on berberine with a special focus on its oral bioavailability. **Fitoterapia**, v. 109, p. 274–282, 2016.

MA, W. et al. Design, synthesis and biological evaluation of acridone glycosides as selective BChE inhibitors. **Carbohydrate Research**, v. 491, p. 1–17, 2020.

MAK, S. et al. Synergistic inhibition on acetylcholinesterase by the combination of berberine and palmatine originally isolated from Chinese medicinal herbs. **Journal of Molecular Neuroscience**, v. 53, n. 3, p. 511–516, 2014.

MANASA, N; ASHADEVI, J. S. Impact of *Phyllanthus amarus* extract on antioxidant enzymes in *Drosophila melanogaster*. **Journal of Applied Biology & Biotechnology**, v. 3, n. 6, p. 43–47, 2015.

MANUAL KOLLARETH, D. J. et al. Fish Oil Prophylaxis Protects against 3-Nitropropionic Acid-Induced Oxidative Impairments in Striatum and Cerebellum in Male Rat Brain. **Neurochemistry & Neuropharmacology**, v. 3, n. 1, p. 1–9, 2017.

MARTINEZ, D. S. T.; ALVES, O. L. Interaction of nanomaterials with biosystems and nanotoxicology: towards regulation. **Ciência e Cultura**, v. 65, n. 3, p. 32–36, 2013.

MEHRA, M.; SHEORAIN, J.; KUMARI, S. **Synthesis of berberine loaded polymeric nanoparticles by central composite design**. AIP Conference Proceedings. **Anais...**2016.

MIRANDA G. C., SANTOS P. D. F., SILVA J. T., LEIMANN F. V., BORGES B. F., ABREU R, INEU R. P., Gonçalves O. H. Influence of nanoencapsulated lutein on acetylcholinesterase activity: In vitro determination, kinetic parameters, and in silico docking simulations. **Food Chemistry**. v. 307, 2020.

MOTA, W. M. et al. Evaluation of acetylcholinesterase inhibition by extracts from medicinal plants. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 14, n. 4, p. 624–628, 2012.

MUSHTAQ, G. et al. Status of Acetylcholinesterase and Butyrylcholinesterase in Alzheimer's Disease and Type 2 Diabetes Mellitus. **CNS & Neurological Disorders - Drug Targets**, v. 13, n. 8, p. 1432–1439, 2014.

NAVROTSKAYA, V. V. et al. Berberine Prolongs Life Span and Stimulates Locomotor Activity of *Drosophila melanogaster*. **American Journal of Plant Sciences**, v. 3, n. 7, p. 1037–1040, 2012.

NAVROTSKAYA, V. V. et al. Berberine Attenuated Aging-Accelerating Effect of High Temperature in *Drosophila* Model. **American Journal of Plant Sciences**, v. 5, n. 3, p. 275–278, 2014.

NEDOVIC, V. et al. An overview of encapsulation technologies for food applications. **Procedia Food Science**, v. 1, p. 1806–1815, 2011.

ONG, C. et al. *Drosophila melanogaster* as a model organism to study nanotoxicity. **Nanotoxicology**, v. 9, n. 3, p. 396–403, 2014.

ORSOLIN, P. C.; NEPOMUCENO, J. C. Carcinogenic potential of turmeric (*Curcuma longa* L.) identified by test for detection of tumor clones in *Drosophila melanogaster*. **Revista do Núcleo Interdisciplinar de Pesquisa e Extensão do UNIPAM**, v. 6, n.

6, p. 55–69, 2009.

PALOMERO, J. et al. Effects of aging on the susceptibility to the toxic effects of cyclosporin A in rats. Changes in liver glutathione and antioxidant enzymes. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 30, n. 8, p. 836–845, 2001.

PANDEY, U. B.; NICHOLS, C. D. Human disease models in *Drosophila melanogaster* and the role of the fly in therapeutic drug discovery. **Pharmacological Reviews**, v. 63, n. 2, p. 411–436, 2011.

PATIL, S. et al. Protective effect of berberine, an isoquinoline alkaloid ameliorates ethanol-induced oxidative stress and memory dysfunction in rats. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 136, p. 13–20, 2015.

PEREIRA, M. E.; ADAMS, A. I. H.; SILVA, N. S. 2,5-Hexanedione inhibits rat brain acetylcholinesterase activity in vitro. **Toxicology Letters**, v. 146, n. 3, p. 269–274, 2004.

PEZZEMENTI, L.; NACHON, F.; CHATONNET, A. Evolution of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in the vertebrates: An atypical butyrylcholinesterase from the medaka *oryzias latipes*. **PLoS ONE**, v. 6, n. 2, 2011.

PISOSCHI, A. M. et al. Nanoencapsulation techniques for compounds and products with antioxidant and antimicrobial activity - A critical view. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 157, p. 1326–1345, 2018.

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

REZAEI, A.; FATHI, M.; JAFARI, S. M. Nanoencapsulation of hydrophobic and low-soluble food bioactive compounds within different nanocarriers. **Food Hydrocolloids**, v. 88, p. 146–162, 2019.

SADEGHNIA, H. R. et al. Berberine protects against glutamate-induced oxidative stress and apoptosis in PC12 and N2a cells. **Iranian Journal of Basic Medical Sciences**, v. 20, p. 594–603, 2017.

SAHIBZADA, M. et al. Bioavailability and Hepatoprotection enhancement of Berberine and its nanoparticles prepared by liquid antisolvent method. **Saudi Journal of Biological Sciences**, 2020.

SAHIBZADA, M. U. K. et al. Berberine nanoparticles with enhanced *in vitro* bioavailability: Characterization and antimicrobial activity. **Drug Design, Development and Therapy**, v. 12, p. 303–312, 2018.

SALVIA-TRUJILLO, L.; MARTIN-BELLOSO, O.; JULIAN MCCLEMENTS, D. Excipient nanoemulsions for improving oral bioavailability of bioactives. **Nanomaterials**, v. 6, n. 1, p. 1–17, 2016.

SCHOR, J. Clinical Applications for Berberine: Potential therapeutic applications in metabolic syndrome, type 2 diabetes, and dyslipidemia. **Natural Medicine Journal**, v. 4, n. 12, 2012.

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

SHISHIR, M. R. I. et al. Advances in micro and nano-encapsulation of bioactive compounds using biopolymer and lipid-based transporters. **Trends in Food Science and Technology**, v. 78, p. 34–60, 2018.

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

SIQUEIRA, J. C. .; FORTUNATO, W. S. L. .; FILHO, A. S. C. **Application of nanotechnology in the food industry: a literature review**. In: ANAIS JORNADA DE INOVAÇÃO E PESQUISA, 2017, Recife. **Anais...**Recife: Faculdade São Miguel, 2017, p.34.

SNEADER, W. **Drug Discovery: A History**. Chichester: John Wiley & Sons Ltd, 2006.

SOARES, D. C. S. et al. Treatment with pentylentetrazole (PTZ) and 4-aminopyridine (4-AP) differently affects survival, locomotor activity, and biochemical markers in *Drosophila melanogaster*. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 442, n. (1-2), p. 129–142, 2018.

SOLANKI, R. et al. Bovine Serum Albumin Nanoparticles for the Efficient Delivery of Berberine: Preparation, Characterization and *In vitro* biological studies. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 608, 2020.

SU, T. et al. Synthesis and biological evaluation of berberine-thiophenyl hybrids as multi-functional agents: Inhibition of acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase, and A $\beta$  aggregation and antioxidant activity. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 21, n. 18, p. 5830–5840, 2013.

SUGANYA, V.; ANURADHA, V. Microencapsulation and Nanoencapsulation: A Review. **International Journal of Pharmaceutical and Clinical Research**, v. 9, n. 3, p. 233–239, 2017.

VUDDANDA, P. R. et al. Investigations on agglomeration and haemocompatibility of Vitamin E TPGS surface modified berberine chloride nanoparticles. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 1–11, 2014.

WANG, H. et al. Metformin and berberine, two versatile drugs in treatment of common metabolic diseases. **Oncotarget**, v. 9, n. 11, p. 10135–10146, 2017.

WANG, S. et al. Fortification of dietary biopolymers-based packaging material with bioactive plant extracts. **Food Research International**, v. 49, n. 1, p. 80–91, 2012.

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

WHITE, D. et al. Deficits in the vesicular acetylcholine transporter alter lifespan and behavior in adult *Drosophila melanogaster*. **Neurochemistry International**, v. 137, p. 1–10, 2020.

XU, Z. et al. *Rhizoma coptidis* and berberine as a natural drug to combat aging and aging-related diseases via anti-oxidation and AMPK activation. **Aging and Disease**, v. 8, n. 7, p. 760–777, 2017.

YADAV, A. K.; SRIKRISHNA, S.; GUPTA, S. C. Cancer Drug Development Using *Drosophila* as an *in vivo* Tool: From Bedside to Bench and Back. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 37, n. 9, p. 789–806, 2016.

YAMAGUCHI, M.; YOSHIDA, H. *Drosophila* as a model organism. **Advances in Experimental Medicine and Biology**. p. 1–10, 2018.

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

YIN, J.; YE, J.; JIA, W. Effects and mechanisms of berberine in diabetes treatment. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, v. 2, n. 4, p. 327–334, 2012.

ZHANG, L. et al. Development and *in vitro* evaluation of sustained release Poloxamer 407 (P407) gel formulations of ceftiofur. **Journal of Controlled Release**, v. 85, n. 1–3, p. 73–81, 2002.

ZHANG, Q. et al. Preventive effect of *Coptis chinensis* and berberine on intestinal injury in rats challenged with lipopolysaccharides. **Food and Chemical Toxicology**, v. 49, n. 1, p. 61–69, 2011.

ZHANG, R. et al. Berberine reverses lapatinib resistance of HER2-positive breast cancer cells by increasing the level of ROS. **Cancer Biology and Therapy**, v. 17, n. 9, p. 925–934, 2016.

ZHANG, Y. et al. Effects of  $\beta$ -cyclodextrin on the intestinal absorption of berberine hydrochloride, a P-glycoprotein substrate. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 59, p. 363–371, 2013.

ZHOU, J. Y.; ZHOU, S. W. Protective effect of berberine on antioxidant enzymes and positive transcription elongation factor b expression in diabetic rat liver. **Fitoterapia**, v. 82, n. 2, p. 184–189, 2011.