



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA



**Carreadores Lipídicos Nanoestruturados que encapsulam óleos essenciais
como potencial tratamento contra Alzheimer em modelo de *Drosophila
melanogaster***

KARINE FONSECA DOS SANTOS

UBERLÂNDIA-MG

2024



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA



**Carreadores Lipídicos Nanoestruturados que encapsulam óleos essenciais
como potencial tratamento contra Alzheimer em modelo de *Drosophila*
*melanogaster***

Aluna: Karine Fonseca dos Santos

Orientadora: Dra. Lígia Nunes de Moraes Ribeiro

Coorientadora: Dra. Tamiris Sabrina Rodrigues

**Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Uberlândia
como parte dos requisitos para
obtenção do Título de Mestre em
Genética e Bioquímica (Área
Bioquímica).**

UBERLÂNDIA-MG

2024

Ficha Catalográfica Online do Sistema de Bibliotecas
da UFU com dados informados pelo(a) próprio(a)
autor(a).

- S237 Santos, Karine Fonseca dos, 1998-
2024 Carreadores Lipídicos Nanoestruturados que encapsulam óleos essenciais como potencial tratamento contra Alzheimer em modelo de *Drosophila melanogaster* [recurso eletrônico] / Karine Fonseca dos Santos. - 2024.
- Orientadora: Lígia Nunes de Moraes
Ribeiro. Coorientadora: Tamiris Sabrina
Rodrigues. Dissertação (Mestrado) -
Universidade Federal de
Uberlândia, Pós-graduação em Genética e Bioquímica.
Modo de acesso: Internet.
Disponível em:
<http://doi.org/10.14393/ufu.di.2024.12>Inclui
bibliografia.
Inclui ilustrações.
1. Genética. I. Ribeiro, Lígia Nunes de
Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o
AACR2:

Gizele Cristine Nunes do Couto -
CRB6/2091 Nelson Marcos Ferreira -
CRB6/3074



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica

Av. Pará 1720, Bloco 2E, Sala 244 - Bairro Umuarama, Uberlândia-MG, CEP 38400-902
Telefone: +55 (34) 3225-8438 - www.ppggb.ibtec.ufu.br - ppggb@ufu.br



ATA DE DEFESA - PÓS-GRADUAÇÃO

Programa de Pós-Graduação em:	Genética e Bioquímica				
Defesa de:	Dissertação de Mestrado Acadêmico/PPGGB				
Data:	Trinta e um de janeiro de dois mil e vinte e quatro	Hora de início:	09:00h	Hora de encerramento:	09:30H
Matrícula do Discente:	12122GBI004				
Nome do Discente:	Karine Fonseca dos Santos				
Título do Trabalho:	Carreadores Lipídicos Nanoestruturados que encapsulam óleos essenciais como potencial tratamento contra Alzheimer em modelo de <i>Drosophila melanogaster</i> .				
Área de concentração:	Bioquímica				
Linha de pesquisa:	Nanobiotecnologia				
Projeto de Pesquisa de vinculação:	Nanoformulações lipídicas com atividade multiterapêutica				

Aos trinta e um dias do mês de janeiro de dois mil e vinte e quatro, às 09:00h, reuniu-se via web conferência pela plataforma Cisco Webex, em conformidade com a Portaria nº 36, de 19 de março de 2020 da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES e Resolução de nº 06/2020 do Conselho de Pesquisa e Pós-graduação pela Universidade Federal de Uberlândia, a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Genética e Bioquímica, assim composta: Professores Doutores: Lígia Nunes de Moraes Ribeiro (Orientadora), Anderson de Oliveira Souza e Ana Carolina Costa Santos. A participação dos dois últimos se deu por epístola. Iniciando os trabalhos o (a) presidente Dr (a). Lígia Nunes de Moraes Ribeiro apresentou a Comissão Examinadora e o candidato (a), agradeceu a presença dos participantes, e concedeu ao Discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação do Discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa. A seguir o senhor (a) presidente procedeu a leitura das epístolas enviadas pelos membros da banca. Em seguida os membros presentes, passaram a arguir o(a) candidato(a). Ultimada a leitura das epístolas e a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu o resultado final, considerando o(a) candidato(a):

(A) PROVADO.

Esta defesa de Dissertação de Mestrado é parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre. O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, a legislação pertinente e a regulamentação interna da UFU. Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos. Foi lavrada a presente ata que após lida e achada conforme foi assinada pela Banca Examinadora.



Documento assinado eletronicamente por **Ana Carolina Costa Santos, Usuário Externo**, em 31/01/2024, às 09:42, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Lígia Nunes de Moraes Ribeiro, Usuário Externo**, em 31/01/2024, às 09:47, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Anderson de Oliveira Souza, Usuário Externo**, em 31/01/2024, às 20:34, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **5088670** e o código CRC **D89C5ECD**.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA



**Carreadores Lipídicos Nanoestruturados que encapsulam óleos essenciais
como potencial tratamento contra Alzheimer em modelo de *Drosophila
melanogaster***

ALUNA: Karine Fonseca dos Santos

COMISSÃO EXAMINADORA

Presidente: Dra. Lígia Nunes de Moraes Ribeiro (Orientadora)

Examinadores:

Membro Externo: Dr. Anderson de Oliveira Souza

Membro Interno: Dra. Ana Carolina Costa Santos

Data de Defesa: 31/01/2024

As sugestões da Comissão Examinadora e as Normas do PGGB para o formato da Dissertação/Tese foram contempladas

LÍGIA NUNES DE MORAIS RIBEIRO

UBERLÂNDIA-MG
2024

“Tente uma, duas, três vezes e se possível tente a quarta, a quinta e quantas vezes for necessário. Só não desista nas primeiras tentativas, a persistência é amiga da conquista. Se você quer chegar aonde a maioria não chega, faça o que a maioria não faz.”

Bill Gates

Dedico este trabalho aos meus pais, **Edson e Lucinei**, pelo apoio, incentivo e amparo. A meu esposo **Daniel**, pelo companheirismo e motivação. E a minha sobrinha **Luiza**, por me motivar a nunca parar de questionar, crescer e aprender.

AGRADECIMENTOS

À Deus por me capacitar e dar forças e esperança para seguir em frente e executar todas as coisas necessárias, mesmo quando à primeira vista me parecem impossíveis.

Ao meu esposo Daniel, pelo companheirismo e motivação diária, por me ajudar a nunca desistir.

Aos meus pais, Edson e Lucinei, pelo amor, cuidado, carinho, incentivo, patrocínio e por acreditarem e investirem em meu potencial.

Às minhas irmãs Karen e Karoline, por me apoiarem e me ampararem sempre que necessário.

À minha querida sobrinha Luiza, por me trazer tanta alegria e encorajamento.

Aos meus sogros, Eva e Daniel, por me apoiarem e ajudarem sempre que preciso.

À minha orientadora Dra. Ligia Nunes, por me abrir as portas, pelo conhecimento compartilhado comigo, por me ajudar a encontrar novas soluções para contornar as dificuldades que apareceram no percurso. E por se dedicar tanto a este trabalho e à pesquisa, se preocupando para que os produtos desenvolvidos na pesquisa científica cheguem até a população em geral.

À minha coorientadora Dra. Tamiris Sabrina, pelo grande exemplo, amizade, incentivo, ajuda, apoio, por me ajudar a ter esperança, por chamar minha atenção quando necessário, por se dedicar a pesquisa, ao laboratório e aos projetos de extensão, e por fazer tanto por mim e por este trabalho.

À Dra. Luciana Bastos, por cada ensinamento e por me apresentar ao PPGGB e aos professores, e possibilitar o desenvolvimento deste trabalho.

Ao professor Dr. Carlos Ueira, por me abrir as portas e por dar tantas contribuições a este trabalho.

À professora Dra. Ana Maria Bonetti, por se preocupar comigo e me incentivar tanto.

À Dra. Lúbia Cristina e à Dra. Débora Oliveira do Laboratório de Patologia Bucal, por colaborarem tanto com o trabalho.

À toda a equipe do LABGEN, Michelle, Rafael Bernardes, Rafael Alves, Serena, Matheus, Ana Carolina, Kayllane, Ana Beatriz, Joyce, Bruno, Alexandre, Pedro, Táríka, Luiz, pelas risadas, incentivo e ajuda.

À toda a equipe do NANOBIO, Elenice, Henrique, Tatiana, João Pedro, Sabrina e Lucas Yan, pelo apoio, ajuda e conhecimentos compartilhados.

À Letícia por todo o tempo que passamos juntas no mestrado e por tudo o que me ajudou e ensinou.

À Janaína da secretaria do PPGGB por sempre tirar tão prontamente as minhas dúvidas.

Às minhas amigas Evelise, Adélia, Mychelle, Daniela e Rosetelma, por todo o apoio e incentivo.

A todos os membros da Banca, por se disponibilizarem tão prontamente para avaliarem o trabalho neste processo.

À Universidade Federal de Uberlândia pela infraestrutura, equipamentos e materiais para a realização deste trabalho.

À agência de fomento CAPES, pela bolsa de estudos.

À Agência Intelecto/UFU pela avaliação e orientações durante todo o processo de pedido de Patente.

À todas as pessoas que trabalham na limpeza e manutenção da UFU, em especial do bloco 2E, por possibilitarem um ambiente limpo e seguro para trabalhar.

A todos que colaboraram no desenvolvimento deste trabalho.

APOIO FINANCEIRO

O presente trabalho foi realizado na Universidade Federal de Uberlândia (Uberlândia - Minas Gerais, Brasil), no Laboratório de Nanobiotecnologia (NANOBIO) e no Laboratório de Genética (LABGEN), do Instituto de Biotecnologia, e no Laboratório de Patologia Oral, da Faculdade de Odontologia. A pesquisa foi fomentada pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal do Ensino Superior (CAPES).

SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO	1
Capítulo I	2
1 DOENÇA DE ALZHEIMER	3
2 PRODUTOS NATURAIS.....	4
2.1 Óleos Essenciais.....	5
2.1.1 Óleo essencial de Copaíba	6
2.1.2 Óleo essencial de Olíbano	6
2.2 Óleos e Manteigas Vegetais	8
3 NANOTECNOLOGIA	8
3.1 Nanopartículas Lipídicas.....	8
3.2 Nanoencapsulação de óleos naturais para o tratamento de doenças .	11
4 <i>Drosophila melanogaster</i>	12
4.1 <i>Drosophila melanogaster</i> como organismo modelo.....	12
4.2 Sistema GAL4/UAS em <i>Drosophila</i>	13
5 CONCLUSÕES	14
REFERÊNCIAS.....	15
Capítulo II	23
RESUMO.....	24
ABSTRACT.....	25
1 INTRODUÇÃO	27
2 MATERIAIS E MÉTODOS	28
2.1 Área de trabalho.....	28
2.2 Materiais	29
2.3 Preparo das formulações de carreadores lipídicos nanoestruturados que encapsulam óleo essencial de copaíba (NLC/COPA) e olíbano (NLC/OLI)	29
2.4 Caracterização e acompanhamento da estabilidade físico-química das formulações.....	29

2.5 Morfologia das nanopartículas	30
2.6 Estoque de moscas	30
2.7 Ensaio de nanotoxicidade in vivo em modelo de <i>Drosophila melanogaster</i>	30
2.8 Avaliação da Taxa de Eclosão	31
2.9 Avaliação da atividade Antineurodegenerativa.....	32
2.10 Análise Histológica	32
2.11 Coloração com vermelho Congo	33
2.12 Análises estatísticas	33
3 RESULTADOS.....	34
3.1 Caracterização estrutural e estabilidade físico-química das formulações.....	34
3.2 Morfologia das nanopartículas	35
3.3 Ensaio de nanotoxicidade	36
3.4 Avaliação da taxa de eclosão.....	38
3.5 Avaliação da atividade Antineurodegenerativa.....	39
4 DISCUSSÃO	43
5 CONCLUSÕES	47
REFERÊNCIAS.....	48

APRESENTAÇÃO

A doença de Alzheimer (DA) é uma doença neurodegenerativa, caracterizada pelo acúmulo de proteína beta-amiloide ($A\beta$), emaranhados neurofibrilares de proteína tau e neurodegeneração. Atualmente existem apenas 7 medicamentos aprovados para o tratamento da doença que não levam a cura, 5 deles objetivam aliviar os sintomas, e os demais retardam a deterioração cognitiva e funcional em Alzheimer precoce. Assim, destaca-se a importância de avaliar novos candidatos terapêuticos para o tratamento, e, se possível, a cura da DA. Os produtos naturais, em especial os óleos essenciais (OE) e manteigas vegetais, são o enfoque deste trabalho na busca de novos tratamentos, e por meio da nanotecnologia e das nanoformulações, as propriedades destes produtos podem ser aprimoradas em formulações estáveis, seguras e eficazes.

No capítulo I é fornecida uma revisão teórica abordando temas de principal relevância para a compreensão do trabalho. É descrita a fisiopatologia da doença da DA e a necessidade de novas terapias eficazes para seu tratamento. Os produtos naturais são destacados como a principal fonte para o desenvolvimento de novos candidatos terapêuticos, com enfoque para os OE e os óleos e manteigas vegetais. Os OE apresentam características como alta volatilidade, hidrofobicidade, toxicidade e baixa biodisponibilidade, que podem ser melhoradas por meio da nanoencapsulação, especialmente em carreadores lipídicos estruturados (NLC). E por último são exibidas as características que fazem da mosca *Drosophila melanogaster* um excelente modelo para o estudo de neurológicas doenças humanas, em especial a DA.

No capítulo II é apresentado, na forma de artigo científico, o desenvolvimento de formulações de NLC que encapsulam óleo essencial de copaíba e olíbano. Os sistemas são avaliados quanto à estabilidade físico-química à longo prazo, nanotoxicidade e atividade antineurodegenerativa, usando como modelo a mosca *Drosophila melanogaster*. O intuito é obter potenciais candidatos terapêuticos, seguros, eficazes e de baixo custo como um futuro tratamento da DA.

Capítulo I

1 DOENÇA DE ALZHEIMER

Com o aumento da expectativa de vida ocasionado pelo avanço da ciência médica, doenças neurodegenerativas como a Doença de Alzheimer (DA) aumentarão entre a população, devido ao envelhecimento da mesma (DESHPANDE, GOGIA & SINGH, 2019). Além disso, mudanças no estilo de vida e nos hábitos alimentares, aumento do estresse e condições ambientais influenciam ainda mais no aumento de tais doenças neurodegenerativas (DESHPANDE, GOGIA & SINGH, 2019).

A DA é uma doença neurodegenerativa altamente prevalente, sendo a causa mais comum de demência (DESHPANDE, GOGIA & SINGH, 2019; ALZHEIMER'S ASSOCIATION, 2020). Entre as pessoas com 65 anos ou mais, 12,5 % têm Alzheimer, este índice aumenta para 50 % em idosos acima de 85 anos (WILLIAMSON *et al.*, 2009).

A DA é caracterizada por um acúmulo de placas de proteína beta-amiloide entre neurônios, emaranhados neurofibrilares de proteína tau intraneurônios e perda de neurônios (HARDY & SELKOE, 2002; MATTSON, 2004; DESHPANDE, GOGIA & SINGH, 2019; ALZHEIMER'S ASSOCIATION, 2020). Várias hipóteses explicam sua etiologia. Dentre elas destaca-se a hipótese amiloide, que afirma que a maioria das patologias da DA são causadas pela deposição do peptídeo amiloide- β 42 ($A\beta$ 42), que é gerado pelo processamento proteolítico da proteína precursora amiloide (APP) pela enzima β -secretase (BACE1) (HARDY & SELOKOE 2002; LANE *et al.*, 2018).

Outra alteração cerebral que pode ocorrer em portadores da DA é a atrofia desse tecido, devido a morte celular (SARKAR *et al.*, 2016; ALZHEIMER'S ASSOCIATION, 2020). A função cerebral é também comprometida pela diminuição da capacidade de metabolizar a glicose e gerar energia para os neurônios (ALZHEIMER'S ASSOCIATION, 2020).

O aparecimento dos sintomas ocorre somente após anos de alterações cerebrais, uma vez que os neurônios relacionados ao pensamento, aprendizado e memória são danificados ou destruídos (ALZHEIMER'S ASSOCIATION, 2020; DESHPANDE, GOGIA & SINGH, 2019). Ao passo que a doença progride, são

afetadas também funções corporais básicas, como andar e engolir (ALZHEIMER'S ASSOCIATION, 2020).

Muitos estudos têm sido realizados para encontrar tratamentos eficazes para a DA, no entanto, ao alcançar as diferentes fases dos ensaios clínicos, muitos são reprovados (CUMMINGS, MORSTORF & ZHONG, 2014; GODYN *et al.*, 2016; KIM *et al.*, 2022; KHAN *et al.*, 2023). Atualmente existem apenas 7 medicamentos aprovados para o tratamento da doença, sendo importante destacar que eles não promovem a cura. Destes medicamentos, 5 aliviam os sintomas, a saber, donepezil, rivastigmina, galantamina, memantina e memantina em combinação com donepezil, que aliviam os sintomas. E os outros 2, aducanumabe e lecanemabe, eliminam o acúmulo de β -amiloide do cérebro, retardando a deterioração cognitiva e funcional em casos de Alzheimer precoce (ALZHEIMER'S ASSOCIATION, 2023).

Visto o impacto mundial da DA e a necessidade de novas terapias eficazes para seu tratamento, é de extrema importância entender sua patologia e avaliar novos candidatos terapêuticos (CUMMINGS, MORSTORF & ZHONG, 2014; VAZ & SILVESTRE, 2020).

2 PRODUTOS NATURAIS

Os produtos naturais são a principal fonte para o desenvolvimento de novos tratamentos (EKIERT & SZOPA, 2020; ZHANG *et al.*, 2020). Há mais de 4 mil anos seus efeitos terapêuticos têm sido utilizados na descoberta de medicamentos (ZHANG *et al.*, 2020). Tais produtos derivam de plantas, bactérias, vírus, fungos, algas e moléculas endógenas de humanos e animais (EKIERT & SZOPA, 2022).

As atividades biológicas dos produtos naturais despertam grande interesse das indústrias farmacêuticas, alimentícias e de cosméticos, e o número de estudos científicos nessa área cresce rapidamente (EKIERT & SZOPA, 2020; EKIERT & SZOPA, 2022). E Com o avanço de ferramentas tecnológicas e da nanotecnobiologia, mais propriedades interessantes podem ser obtidas dos produtos naturais e muitas características deles podem ser melhoradas, como aumento da solubilidade e da atividade (RIBEIRO *et al.*, 2021).

Dentre os produtos naturais, o enfoque deste trabalho são os óleos essenciais e os óleos e manteigas vegetais.

2.1 Óleos Essenciais

Os óleos essenciais (OE) são compostos voláteis, naturais e complexos, produzidos pelo metabolismo secundário das plantas (BAKKALI *et al.*, 2008). Podem ser sintetizados por diferentes órgãos vegetais e são armazenados em diferentes locais da planta (BAKKALI *et al.*, 2008).

Eles podem ser extraídos de várias famílias de plantas (BAKKALI *et al.*, 2008; VIGAN, 2010) e são geralmente obtidos por vapor ou hidrodestilação (BAKKALI *et al.*, 2008). São líquidos viscosos, voláteis, lipossolúveis e solúveis em solventes orgânicos (Bakkali *et al.* 2008). A composição de cada OE depende não só da família, mas também da parte da planta da qual é extraído, do solo onde a planta cresce, da época e condições de colheita e também da forma de extração (VIGAN, 2010). Na natureza, os OE atuam na proteção das plantas contra bactérias, vírus, fungos, insetos e herbívoros (BAKKALI *et al.*, 2008). Além disso, podem atrair insetos favorecendo a dispersão de pólenes e sementes (BAKKALI *et al.*, 2008).

Os OE apresentam diversas aplicações, sendo utilizados em perfumes, aromatizantes de alimentos, produtos aromáticos, tintas, produtos de limpeza e medicamentos (PLANT *et al.*, 2019). Eles são conhecidos pela ação antisséptica, bactericida e fungicida (BONA *et al.*, 2016; CARBONE *et al.*, 2018; GUIDOTTI-TAKEUCHI *et al.*, 2022). São usados em embalsamamento, conservação de alimentos e como antimicrobianos, analgésicos, sedativos, anti-inflamatórios, espasmolíticos e anestésicos locais (BAKKALI *et al.*, 2008). São também utilizados no tratamento de diversas doenças, tais como da cavidade oral (MANCONI *et al.*, 2018), respiratórias (HEDAYAT, 2008), reumáticas (PAIXÃO, 2021), inflamatórias intestinais (JOSHI *et al.*, 2022), cardiovasculares (SALJOUGHIAN *et al.*, 2018), câncer (BHALLA *et al.*, 2013; PAVITHRA *et al.*, 2019;) e doenças neurológicas (WANG & HINBOCKEL, 2018; SATTAYAKHOM, WICHIT & KOOMHIN, 2023; ZHOU *et al.*, 2023), dentre outras. Dentre os OE com potencial terapêutico, podemos citar os OE de copaíba e olíbano.

2.1.1 Óleo essencial de Copaíba

O óleo essencial de copaíba (OEC) é proveniente de árvores de copaíba (*Copaifera* spp.) pertencentes à família Leguminosae e subfamília Caesalpinoideae (GOMES *et al.*, 2012). As copaíbas são amplamente distribuídas no norte da América do Sul, especialmente na floresta amazônica brasileira (VEIGA & PINTO, 2002). O OEC é um líquido concentrado que pode ser comumente obtido por destilação a vapor da oleorresina da copaíba (URASAKI *et al.*, 2020) e é composto por sesquiterpenos (ARRUDA *et al.*, 2019).

O óleo de copaíba é muito utilizado devido às suas atividades anti-inflamatória, cicatrizante e antisséptica (SILVA *et al.*, 2012), além de apresentar efeito antiasmático (CAPUTO *et al.*, 2020). O OEC pode ter utilidade como tratamento tópico para acne leve (GOMES *et al.*, 2012) e também foi responsável pelo aumento da biodisponibilidade de sumatriptano, além de interagir com os receptores opioides do sistema nervoso central, tendo papel efetivo no controle da enxaqueca em modelo de *zebrafish* (RIBEIRO *et al.*, 2020).

O OEC regula positivamente várias vias de sinalização em células neuronais de maneira dependente do tempo e da dose (URASAKI *et al.*, 2020). No estudo de Lima e colaboradores (2021), os OE de gerânio e OEC apresentaram efeito inibitório da enzima acetilcolinesterase, indicando uma possível bioatividade para tratar a doença de Alzheimer por intensificar a neurotransmissão colinérgica (KUPPUSAMY *et al.*, 2017). Esses estudos confirmam o potencial do OEC de para o tratamento de doenças neurodegenerativas (LIMA *et al.*, 2021).

2.1.2 Óleo essencial de Olíbano

O olíbano (frankincense; OEO) é uma oleorresina que provém de árvores do gênero *Boswellia* (HAN, RODRIGUEZ & PARKER, 2017; DECARLO *et al.*, 2019). Os produtos do olíbano têm sido muito utilizados na medicina chinesa e indiana, sendo eles, a resina, o extrato e o OEO (HAN, RODRIGUEZ & PARKER, 2017).

As preparações de *Boswellia* são usadas no tratamento de doenças inflamatórias das articulações e ossos, medula espinhal, colite ulcerosa, síndrome do intestino irritável, sinusite, reumatismos e distúrbios respiratórios como a bronquite (AL-YASIRY & KICZOROWSKA, 2016). A inalação e o consumo de *Boswellia olibanum* reduz o risco de asma. Os produtos de olíbano também são usados como drogas expectorantes, antissépticas, ansiolíticas, antineuróticas e antibióticas (AL-YASIRY & KICZOROWSKA, 2016; RIBEIRO *et al.*, 2021). Na medicina indiana, representa uma importante droga antirreumática (AL-YASIRY & KICZOROWSKA, 2016). Além disso, a resina tem efeitos analgésicos, tranquilizantes e antibacterianos, e os ácidos boswellicos têm um efeito antiproliferativo em tumores (AL-YASIRY & KICZOROWSKA, 2016). O OEO apresenta atividade biológica em fibroblastos humanos, potencial para modular os processos biológicos de inflamação e remodelação tecidual na pele humana (HAN, RODRIGUEZ & PARKER, 2017).

No sistema nervoso, o OEO é capaz de aumentar o número de seguimentos dendríticos e ramificações nas células neuronais do hipocampo, gerando mais conexões sinápticas e levando assim a melhora do aprendizado e da memória (HAMIDPOUR *et al.*, 2013). Seu uso durante a gestação e lactação evidencia benefícios no desempenho da memória da prole de ratos (BEHESHTI *et al.*, 2018). Há evidências indicando a eficácia do OEO na melhora da memória tanto no cérebro normal quanto das condições de memória prejudicada (BEHESHTI & AGHAIE, 2016). O estudo de BEHESHTI & AGHAIE (2016) demonstrou que a administração crônica de extrato aquoso de olíbano melhorou a memória em ratos modelos de DA. Assim sendo, o olíbano apresenta efeito potencial para ser usado no tratamento de distúrbios cerebrais e de memória (HAMIDPOUR *et al.*, 2013).

Diante dos dados apresentados, acredita-se que os OEC e OEO apresentam grande potencial para tratar doenças neurodegenerativas. Além disso, ferramentas nanotecnológicas, tais como a nanoencapsulação, podem ser extremamente úteis para potencializar o efeito dos OE, garantindo suas propriedades terapêuticas, prevenindo sua degradação, melhorando a estabilidade e reduzindo sua toxicidade, que são suas principais limitações ao uso clínico e em grande escala (RIBEIRO *et al.*, 2021; SILVA *et al.*, 2024).

2.2 Óleos e Manteigas Vegetais

Há séculos, as manteigas e óleos vegetais são utilizados na medicina popular devido aos seus efeitos terapêuticos e cosméticos (POLJSK & GLAVAC, 2022). Atualmente são muito empregados nas indústrias farmacêutica e cosmética, atuando como ingredientes ativos, excipientes e solventes de extração (POLJSK & GLAVAC, 2022).

Eles exibem propriedades antimicrobianas, anti-inflamatórias e antioxidantes, e também estimulam a proliferação celular (POLJSK, KREFT & GLAVAC, 2020). Essas características os tornam promissores no tratamento de feridas cutâneas, sendo eficazes na cicatrização e muitas vezes superando a eficácia de compostos sintéticos (POLJSK, KREFT & GLAVAC, 2020). Os óleos e manteigas vegetais também agem em sinergia com outros compostos ativos, potencializando a atividade deles (SILVA *et al.*, 2020; GERONIMO *et al.*, 2021; CARVALHO *et al.*, 2022). Dentre as manteigas vegetais, com potencial terapêutico, podemos citar a manteiga de Karité (VERMA *et al.*, 2012; ELSEWEDY, SHEHATA & SOLIMAN, 2022).

3 NANOTECNOLOGIA

A nanotecnologia é a engenharia e fabricação de materiais em escala atômica e molecular (FAROKHZAD & LANGER, 2009). É um ramo que tem possibilitado a miniaturização de materiais, melhorando a biodisponibilidade e a eficácia, ao passo que reduz a toxicidade das moléculas ativas carregadas (RIBEIRO *et al.*, 2021).

3.1 Nanopartículas Lipídicas

Dentre as formulações à base de lipídios estão os lipossomas, micro e nanoemulsões, e as nanopartículas lipídicas, que compreendem as nanopartículas lipídicas sólidas (SLN) e carreadores lipídicos nanoestruturados (NLC) (ARAÚJO, RIBEIRO & PAULA, 2019; CIMINO *et al.*, 2021). A Tabela 1 mostra algumas nanopartículas lipídicas que encapsulam diferentes moléculas como potencial tratamento contra Alzheimer.

Tabela 1. Nanopartículas lipídicas que encapsulam diferentes moléculas como potencial tratamento contra Alzheimer.

Nanopartícula lipídica	Composição	Molécula encapsulada	Método usado	Tamanho médio de partícula (nm)	Resultado	Referência
NLC	Palmitoestearato de glicerila, ácido oleico, poloxâmero 188, polissorbato 80	Astaxantina	Homogeneização a quente de alta pressão	142,8 ± 5,02	Diminuição do estresse oxidativo, da via amiloidogênica, da neuroinflamação e da apoptose, e melhora da neurotransmissão colinérgica.	(Shehata, Ismail & Kamel, 2023)
NLC	Revestimento com quitosana ou poloxamer	Extrato liofilizado de <i>Salvia officinalis</i>	Evaporação de solvente	127 ± 0,68 a 140 ± 0,74	Apresentou potencial direcionamento cerebral e liberação controlada.	(MARKOVA <i>et al.</i> , 2022)
NLC	Precirol ATO 5, Labrafac lipophile WL 1349 e Tween 80.	Miricetina	Emulsificação por fusão e Ultrassonicação	89,7 ± 26,0	Melhorou a capacidade de entrega de miricetina no cérebro melhorando o comprometimento cognitiva, em modelo de Alzheimer induzido por Aβ.	(HALDER, PATEL & ACHARYA, 2022)
NLC	Geleol, Miglyol 812 N, Solutol HS 15	Berberina	Emulsificação por fusão e ultrassonicação	186	Apresentou potencial no direcionamento para o cérebro e na prevenção e tratamento da DA.	(RAJU <i>et al.</i> , 2021)
SLN e NLC	Palmitato de cetila e polissorbato 80, Miglyol-812 (apenas no NLC)	Quercetina	Homogeneização a quente seguida de Sonicação	± 200	Foram capazes de reduzir a formação de agregados de proteína Aβ.	(PINHEIRO <i>et al.</i> , 2020)
NLC	Palmitato de cetila, ácido oleico, colesterol, Tween 80	Curcumina	Homogeneização	117,36 ± 1,36	Foi capaz de reduzir as características causadas pelo acúmulo de proteínas Aβ na DA em modelo animal.	(MALVAJERD <i>et al.</i> , 2019)

As nanopartículas lipídicas são sistemas de *drug delivery* constituídos por uma matriz lipofílica sólida que pode incorporar moléculas-ativas hidrofóbicas, sendo estabilizadas por surfactantes (MULLER *et al.*, 2011). Elas são biocompatíveis, aumentam a biodisponibilidade da substância ativa incorporada, prolongam e regulam a liberação e entrega dos compostos em locais específicos e apresentam baixa toxicidade (MUSIELAK, FELICZAK-GUZIŁ & NOWAK, 2022).

Existem duas gerações de nanopartículas lipídicas (Figura 1), a primeira geração são as nanopartículas lipídicas sólidas (SLN) e a segunda geração são os carreadores lipídicos nanoestruturados (NLC) (MÜLLER & RADTKE, 2002; MULLER *et al.*, 2011; DRAGICEVIC & MAIBACH, 2016). A produção de SLN e NLC é muito semelhante (DRAGICEVIC & MAIBACH, 2016), a diferença é que a matriz estrutural dos SLN é composta apenas de lipídios sólidos, ao passo que os NLC são constituídos por uma mistura de lipídios sólidos e líquidos a temperatura ambiente (MÜLLER & RADTKE, 2002; MULLER *et al.*, 2011; DRAGICEVIC & MAIBACH, 2016).

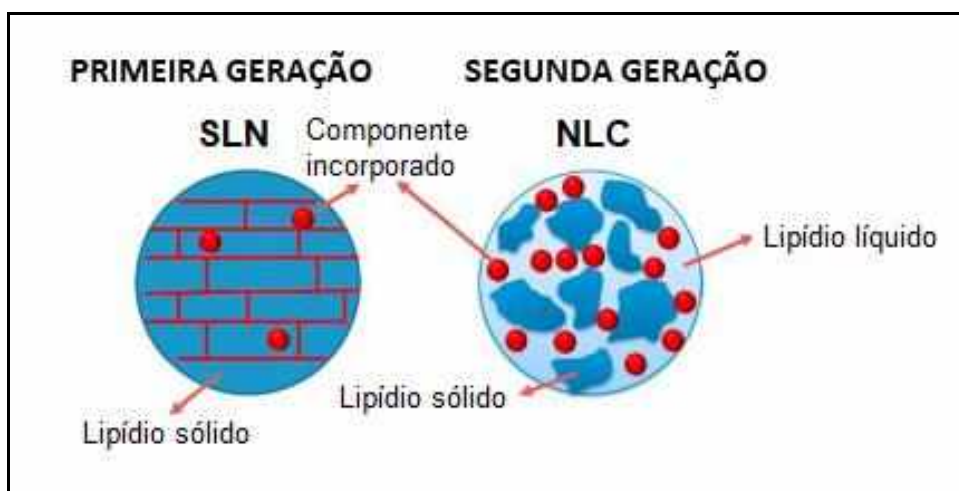


Figura 1. Diferença entre SLN e NLC. Fonte: Adaptado de REZAEI, FATHI & JAFARI (2019).

O NLC tem maior capacidade de carregamento de ativos hidrofóbicos do que o SLN, além disso, ele apresenta ajuste da liberação do fármaco, minimização do risco de sua expulsão ao longo do tempo e maior estabilidade físico-química do que o SLN (FANG *et al.*, 2008; MULLER *et al.*, 2011; PINHEIRO *et al.* 2020).

3.2 Nanoencapsulação de óleos naturais para o tratamento de doenças

Nos últimos anos, o emprego de óleos vegetais e OE vêm se tornando bastante atraente na área farmacêutica. Sua encapsulação por nanopartículas lipídicas é importante para facilitar sua aplicação, proporcionar sua entrega e proteção da luz e temperatura, promover sua estabilidade e potencializar sua ação farmacológica (BAJERSKI *et al.*, 2016). Tais nanocarreadores aumentam a eficácia terapêutica dos compostos naturais e apresentam biocompatibilidade, biodegradabilidade e perfil modificado de liberação (LI *et al.*, 2020; MASIERO *et al.*, 2021; SHAMSUDDIN & ZULFAKAR, 2023). Eles têm potencial farmacêutico para tratar diversas doenças, apresentando maior ou semelhante eficácia e desempenho em relação às formulações convencionais (MASIERO *et al.*, 2021).

A nanoemulsão de óleo de copaíba tem efeito na redução de lesão na leishmaniose tegumentar (MORAES *et al.*, 2018). Também apresenta efeito benéfico na leishmaniose visceral em camundongos, reduzindo a carga parasitária no baço e fígado e melhorando as características histopatológicas (MORAES *et al.*, 2018). Lucca e colaboradores (2018) avaliaram o efeito anti-inflamatório de um hidrogel contendo nanoemulsão de óleo de copaíba. Em seu estudo, foi possível visualizar uma diminuição da hiperplasia da epiderme em cortes histológicos, da infiltração de células inflamatórias e vasodilatação, confirmando a atividade anti-inflamatória (LUCCA *et al.*, 2018).

Silva e colaboradores (2020) verificaram que a formulação do óleo de resina de copaíba como nanoemulsão mostrou-se como promissor antifúngico contra *Paracoccidioides spp.* Tal formulação é mais vantajosa do que o óleo puro, por poder ser administrado por diferentes vias como inalatória e intravenosa (SILVA *et al.*, 2020). Ribeiro e colaboradores (2020) desenvolveram nanoemulsões híbridas compostas de óleo de copaíba e biopolímeros para o carregamento de sumatriptano (2 %) para administração intranasal, para o tratamento de enxaqueca. A formulação se mostrou estável por um ano e a liberação *in vitro* se prolongou por mais de 24 h (RIBEIRO *et al.*, 2020). Os ensaios de nanotoxicidade *in vivo* mostraram que a nanoemulsão não foi tóxica para larvas de *zebrafish* e está apta para o teste de eficácia em humanos (RIBEIRO *et al.*, 2020).

Ribeiro e colaboradores (2021) desenvolveram diferentes NLC compostos por lipídios naturais com o objetivo de selecionar candidatos anti-*Campylobacter jejuni* (CJ) multirresistentes. Dentre todos os NLC, a formulação composta por manteiga de ucuúba e óleo essencial de olíbano foi a que apresentou melhor atividade anti-CJ e segurança (RIBEIRO *et al.*, 2021). Tal formulação foi 2 vezes menos citotóxica que o óleo de olíbano puro, apresentou biocompatibilidade *in vivo* (RIBEIRO *et al.*, 2021). NLC de clotrimazol em combinação com OE de lavanda ou Rosmarinus, melhorou a eficácia da atividade antifúngica contra candidíase tópica (CARBONE *et al.*, 2019). Potencial efeito combinado do antioxidante ácido ferúlico combinado com OE lavanda em nanopartículas lipídicas no tratamento de feridas foi também descrito (CARBONE *et al.*, 2020).

4 *Drosophila melanogaster*

4.1 *Drosophila melanogaster* como modelo biológico alternativo

O invertebrado *Drosophila melanogaster*, conhecido popularmente como “mosca da fruta”, tem sido um importante modelo para o estudo de doenças humanas (GREEVE *et al.* 2004; DESHPANDE, GOGIA & SINGH, 2019). Estima-se que 75 % de todos os genes de doenças humanas apresentem ortólogos funcionais nessa mosca (BIER, 2005; SINGH & IRVINE, 2012). Assim, a *D. melanogaster* tem sido uma poderosa, eficaz e crescente ferramenta para identificar e analisar a função desses genes, bem como para a identificação de novos candidatos terapêuticos (BIER, 2005; SINGH & IRVINE, 2012; YAMAGUCHI & YOSHIDA, 2018; DESHPANDE, GOGIA & SINGH, 2019).

Tais moscas apresentam várias características que as tornam um excelente modelo (YAMAGUCHI & YOSHIDA, 2018). Possuem tamanho corporal pequeno, são facilmente manuseadas e têm baixo custo de manutenção e de manipulação em laboratório (YAMAGUCHI & YOSHIDA, 2018; DESHPANDE, GOGIA & SINGH, 2019). Apresentam ciclo de vida curto (BIER, 2005; YAMAGUCHI & YOSHIDA, 2018) e um grande número de indivíduos podem ser gerados em um curto tempo (BIER, 2005; YAMAGUCHI & YOSHIDA, 2018).

Existem diversas linhagens de moscas utilizadas como modelo de doenças neurodegenerativas, metabólicas, inflamatórias, cardiovasculares, entre outros

(BIER, 2005;). E como a transgenia é um sistema bem estabelecido, é possível introduzir genes de outros organismos nas moscas, tornando a *D. melanogaster* um modelo ideal para estudar doenças progressivas relacionadas à idade (YAMAGUCHI & YOSHIDA, 2018).

Vários modelos de DA já foram desenvolvidos na *D. melanogaster* (SARKAR *et al.*, 2016; DESHPANDE, GOGIA & SINGH, 2019), incluindo moscas transgênicas que expressam incorretamente A β 42 humana, A β 40 humana, APP humana, enzima de clivagem de APP, β -secretase, presenilina e peptídeos A β (JONSON *et al.*, 2015; Cauchi & Van Den Heuvel, 2006; Fernandez-Funez *et al.*, 2015). Essas linhagens apresentam a geração de agregados amiloides, anormalidades morfológicas externas, alterações neuroanatômicas e defeitos no comportamento reflexo motor e na memória (SARKAR *et al.*, 2016; DESHPANDE, GOGIA & SINGH, 2019).

Assim, a *D. melanogaster* é um importante modelo para o estudo e triagem de candidatos terapêuticos para o tratamento da DA (CARMINE-SIMMEN *et al.*, 2009; HARDY & SELKOE, 2002; YAMAGUCHI & YOSHIDA, 2018).

4.2 Sistema GAL4/UAS em *Drosophila*

A utilização do sistema GAL4/UAS em *D. melanogaster* para estudo de expressão gênica teve início em 1993. A ativação do sistema acontece pelo cruzamento entre linhagens expressando GAL4 (*drivers*) com linhagens contendo o elemento UAS (*responder*). Como resultado do cruzamento, a progênie expressa o gene ligado ao UAS sob um padrão de expressão dirigido por GAL4 (ELLIOT & BRAND, 2008; ROOTE & PROKOP, 2013). Nesse estudo o sistema GAL4/UAS foi utilizado para a construção de uma linhagem para o estudo da DA:

GMR-GAL4 > UAS- A β : Machos portando o *driver* GAL 4 (GMR-GAL4) foram cruzados com fêmeas expressando o *responder* UAS (UAS-A β). Assim, GMR-GAL4 direciona a expressão da proteína beta amiloide (UAS-A β) para os olhos compostos da mosca e o cruzamento resulta em degeneração do fenótipo ocular na prole, levando a morte celular neuronal e mimetizando a neuropatologia da DA (DESHPANDE, GOGIA & SINGH, 2019), como mostra a Figura 1.

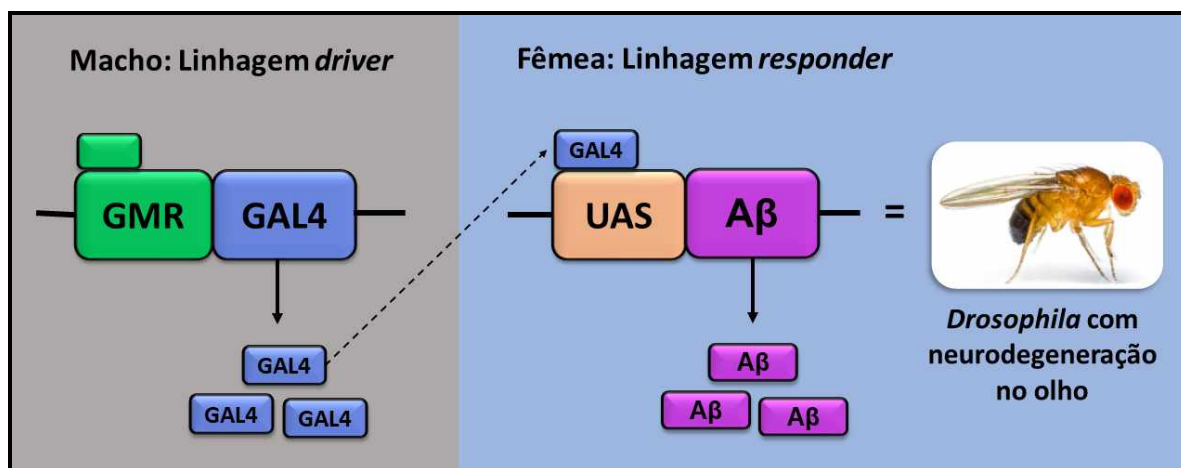


Figura 2. Utilização do sistema GAL4/UAS em *Drosophila melanogaster*, para obtenção da linhagem GMR-GAL4 > UAS- Aβ.

Outros modelos também demonstram o direcionamento da produção de proteína beta amiloide (Aβ) na retina das moscas, levando a degeneração dos tecidos (GREEVE *et al.*, 2004; CROWTHER *et al.*, 2005).

5 CONCLUSÕES

O Alzheimer é uma doença neurodegenerativa muito prevalente em idosos. Atualmente não tem cura e são poucos os medicamentos aprovados para seu tratamento que apenas gerenciam os sintomas. É uma necessidade urgente o desenvolvimento de novos candidatos terapêuticos eficazes para alcançar a cura.

Os produtos naturais, incluindo os OE e manteigas vegetais, apresentam diversas atividades terapêuticas, que podem ser investigadas para o tratamento de muitas doenças, inclusive a DA. A nanoencapsulação de componentes hidrofóbicos como OE é muito interessante, pois permite ultrapassar barreiras físicas e biológicas. A melhora dessas propriedades e a potencialização do potencial ativo faz com que as nanopartículas lipídicas, em especial, os NLC, sejam uma estratégia muito promissora para o encapsulamento de OE no desenvolvimento de novos candidatos terapêuticos.

A mosca *D. melanogaster* é um excelente modelo para o tratamento da DA, por permitir através de genes ortólogos e transgênicos, uma mimetização de características do Alzheimer, que podem ser tratadas e melhoradas por candidatos terapêuticos em estudo.

REFERÊNCIAS

- AL-YASIRY, A. R. M.; KICZOROWSKA, B. Frankincense – therapeutic properties. **Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej**, p. 380–391, 2016. <https://doi.org/10.5604/17322693.1200553>.
- ALZHEIMER'S ASSOCIATION. 2020 Alzheimer's Disease Facts and Figures. **Alzheimer's & Dementia: the journal of the Alzheimer's Association**, v. 16, n. 3, p. 391–460, 2020. <https://doi.org/10.1002/alz.12068>.
- ARAUJO, D. R.; RIBEIRO, L. N.; PAULA, E. Lipid-based carriers for the delivery of local anesthetics. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 16, n. 7, p. 701–714, 2019. <https://doi.org/10.1080/17425247.2019.1629415>.
- ARRUDA, C. *et al.* Occurrence, chemical composition, biological activities and analytical methods on *Copaifera* genus—A review. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 109, p. 1–20, jan. 2019. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.10.030>.
- BAJERSKI, L. *et al.* The use of Brazilian vegetable oils in nanoemulsions: an update on preparation and biological applications. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 52, n. 3, p. 347–363, set. 2016. <https://doi.org/10.1590/s1984-82502016000300001>.
- BAKKALI, F. *et al.* Biological effects of essential oils – A review. **Food and Chemical Toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association**, v. 46, n. 2, p. 446–475, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2007.09.106>.
- BEHESHTI, S. *et al.* Frankincense upregulates the hippocampal calcium/calmodulin kinase II- α during development of the rat brain and improves memory performance. **International journal of developmental neuroscience : the official journal of the International Society for Developmental Neuroscience**, v. 69, n. 1, p. 44–48, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2018.06.011>.
- BEHESHTI, S.; AGHAIE, R. Therapeutic effect of frankincense in a rat model of Alzheimer's disease. **Avicenna Journal of Phytomedicine**, v. 6, n. 4, p. 468–475, 2016. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4967843/>.
- BHALLA, Y.; GUPTA, V. K.; JAIRAK, V. Anticancer activity of essential oils: a review. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 93, n. 15, p. 3643–3653, 26 jul. 2013. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6267>.
- BIER, E. *Drosophila*, the golden bug, emerges as a tool for human genetics. **Nature Reviews Genetics**, v. 6, n. 1, p. 9–23, jan. 2005. <https://doi.org/10.1038/nrg1503>.
- BONA, E. *et al.* Sensitivity of *Candida albicans* to essential oils: are they an alternative to antifungal agents? **Journal of Applied Microbiology**, v. 121, n. 6,

p. 1530–1545, 24 out. 2016. <https://doi.org/10.1111/jam.13282>

CAPUTO, L. S. *et al.* Copaiba oil suppresses inflammation in asthmatic lungs of BALB/c mice induced with ovalbumin. **International Immunopharmacology**, v. 80, p. 106177–106177, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2019.106177>.

CARBONE, C. *et al.* Clotrimazole-Loaded Mediterranean Essential Oils NLC: A Synergic Treatment of Candida Skin Infections. **Pharmaceutics**, v. 11, n. 5, p. 231, 13 maio 2019. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics11050231>.

CARBONE, C. *et al.* Ferulic Acid-NLC with Lavandula Essential Oil: A Possible Strategy for Wound-Healing? **Nanomaterials**, v. 10, n. 5, p. 898, 8 maio 2020. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics11050231>.

CARMINE-SIMMEN, K. *et al.* Neurotoxic effects induced by the *Drosophila* amyloid- β peptide suggest a conserved toxic function. **Neurobiology of Disease**, v. 33, n. 2, p. 274–281, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2008.10.014>.

CARVALHO, F. V. *et al.* Docetaxel Loaded in Copaiba Oil-Nanostructured Lipid Carriers as a Promising DDS for Breast Cancer Treatment. **Molecules**, v. 27, n. 24, p. 8838–8838, 2022. <https://doi.org/10.3390/molecules27248838>.

CAUCHI, R. J.; VAN DEN HEUVEL, M. The Fly as a Model for Neurodegenerative Diseases: Is It Worth the Jump? **Neurodegenerative Diseases**, v. 3, n. 6, p. 338–356, 2006. <https://doi.org/10.1159/000097303>.

CIMINO, C. *et al.* Essential Oils: Pharmaceutical Applications and Encapsulation Strategies into Lipid-Based Delivery Systems. **Pharmaceutics**, v. 13, n. 3, p. 327, 3 mar. 2021. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13030327>.

CROWTHER, D. C. *et al.* Intraneuronal A β , non-amyloid aggregates and neurodegeneration in a *Drosophila* model of Alzheimer's disease. **Neuroscience**, v. 132, n. 1, p. 123–135, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2004.12.025>.

CUMMINGS, J. L.; MORSTORF, T.; ZHONG, K. Alzheimer's disease drug-development pipeline: few candidates, frequent failures. **Alzheimer's Research & Therapy**, v. 6, n. 4, p. 37, 2014. <https://doi.org/10.1186/alzrt269>.

DECARLO, A. *et al.* Compositional analysis of the essential oil of *Boswellia dalzielii* frankincense from West Africa reveals two major chemotypes. **Phytochemistry**, v. 164, p. 24–32, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2019.04.015>.

DESHPANDE, P.; GOGIA, N.; SINGH, A. Exploring the efficacy of natural products in alleviating Alzheimer's disease. **Neural Regeneration Research**, v. 14, n. 8, p. 1321–1329, 2019. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.253509>.

DRAGICEVIC, N.; MAIBACH, H. I. **Percutaneous Penetration Enhancers Chemical Methods in Penetration Enhancement: Nanocarriers**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2016.

EKIERT, H. M.; SZOPA, A. Biological Activities of Natural Products. **Molecules**, v. 25, n. 23, p. 5769, 7 dez. 2020. <https://doi.org/10.3390/molecules25235769>.

EKIERT, H. M.; SZOPA, A. Biological Activities of Natural Products II. **Molecules**, v. 27, n. 5, p. 1519, 2022. <https://doi.org/10.3390/molecules27051519>.

ELLIOTT, D. A.; BRAND, A. H. The GAL4 System : a versatile system for the expression of genes. **Methods in Molecular Biology**, n. 420, p. 79–95, 2008. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-583-1_5.

ELSEWEDY, H. S.; SHEHATA, T. M.; SOLIMAN, W. E. Shea Butter Potentiates the Anti-Bacterial Activity of Fusidic Acid Incorporated into Solid Lipid Nanoparticle. **Polymers**, v. 14, n. 12, p. 2436, 2022. <https://doi.org/10.3390/polym14122436>.

FANG, J.-Y. *et al.* Lipid nanoparticles as vehicles for topical psoralen delivery: Solid lipid nanoparticles (SLN) versus nanostructured lipid carriers (NLC). **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 70, n. 2, p. 633–640, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2008.05.008>.

FAROKHZAD, O. C.; LANGER, R. Impact of nanotechnology on drug delivery. **ACS nano**, v. 3, n. 1, p. 16–20, 2009. <https://doi.org/10.1021/nn900002m>.

FERNANDEZ-FUNEZ, P.; DE MENA, L.; RINCON-LIMAS, D. E. Modeling the complex pathology of Alzheimer's disease in Drosophila. **Experimental neurology**, v. 274, n. 0, p. 58–71, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2015.05.013>.

GERONIMO, G. *et al.* Development of S 75 : R 25 bupivacaine-loaded lipid nanoparticles functionalized with essential oils for treating melanoma. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 96, n. 8, p. 2197–2207, 2021. <https://doi.org/10.1002/jctb.6715>.

GODYŃ, J. *et al.* Therapeutic strategies for Alzheimer's disease in clinical trials. **Pharmacological reports: PR**, v. 68, n. 1, p. 127–138, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.pharep.2015.07.006>.

GREEVE, I. Age-Dependent Neurodegeneration and Alzheimer-Amyloid Plaque Formation in Transgenic Drosophila. **Journal of Neuroscience**, v. 24, n. 16, p. 3899–3906, 2004. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0283-04.2004>.

GUIDOTTI-TAKEUCHI, M. *et al.* Essential Oil-Based Nanoparticles as Antimicrobial Agents in the Food Industry. **Microorganisms**, v. 10, n. 8, p. 1504, 26 jul. 2022. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10081504>

HALDER, T.; PATEL, B.; ACHARYA, N. Design and optimization of myricetin encapsulated nanostructured lipid carriers: In-vivo assessment against cognitive impairment in amyloid beta (1–42) intoxicated rats. **Life Sciences**, v. 297, p. 120479–120479, maio 2022. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2022.120479>.

HAMIDPOUR, R. *et al.* Frankincense (rǔ xiāng; boswellia species): from the selection of traditional applications to the novel phytotherapy for the prevention and treatment of serious diseases. **Journal of Traditional and Complementary Medicine**, v. 3, n. 4, p. 221–226, 2013. <https://doi.org/10.4103/2225-4110.119723>.

HAN, X.; RODRIGUEZ, D.; PARKER, T. L. Biological activities of frankincense essential oil in human dermal fibroblasts. **Biochimie Open**, v. 4, p. 31–35, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.biopen.2017.01.003>.

HARDY, J.; SELKOE, D. J. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. **Science (New York, N.Y.)**, v. 297, n. 5580, p. 353–6, 2002. <https://doi.org/10.1126/science.1072994>.

HEDAYAT, K. M. Essential Oil Diffusion for the Treatment of Persistent Oxygen Dependence in a Three-Year-Old Child With Restrictive Lung Disease With Respiratory Syncytial Virus Pneumonia. **EXPLORE**, v. 4, n. 4, p. 264–266, jul. 2008. <https://doi.org/10.1016/j.explore.2008.04.005>.

JONSON, M. *et al.* Systematic A β Analysis in Drosophila Reveals High Toxicity for the 1-42, 3-42 and 11-42 Peptides, and Emphasizes N- and C-Terminal Residues. **PLOS ONE**, v. 10, n. 7, p. e0133272–e0133272, jul. 2015. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0133272>.

JOSHI, R. K. *et al.* Identification of potentially bioactive compounds from *Blumea lacera* essential oil by gas chromatography-mass spectroscopy and molecular docking studies for targeting inflammatory bowel disease. **Natural Product Research**, p. 1–5, jan. 2022. <https://doi.org/10.1080/14786419.2021.2025368>.

KHAN, T. *et al.* Recent Advancement in Therapeutic Strategies for Alzheimer's Disease: Insights from Clinical Trials. **Ageing Research Reviews**, n. 92, p. 102113, 31 out. 2023. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2023.102113>.

KIM, C. K. *et al.* Alzheimer's Disease: Key Insights from Two Decades of Clinical Trial Failures. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 87, n. 1, p. 1–18, mar. 2022. <https://doi.org/10.3233/JAD-215699>.

KUPPUSAMY, A.; ARUMUGAM, M.; GEORGE, S. Combining in silico and in vitro approaches to evaluate the acetylcholinesterase inhibitory profile of some commercially available flavonoids in the management of Alzheimer's disease. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 95, p. 199–203, fev. 2017. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.11.062>.

LANE, C. A.; HARDY, J.; SCHOTT, J. M. Alzheimer's disease. **European Journal of Neurology**, v. 25, n. 1, p. 59–70, 19 out. 2017. <https://www.doi.org/10.1111/ene.13439>.

LI, Y. *et al.* [Effect of nanostructured lipid carriers (NLCs) in improving stability of essential oils and its application]. **PubMed**, v. 45, n. 3, p. 523–530, 1 fev. 2020. <https://doi.org/10.19540/j.cnki.cjcmm.20191130.301>

LIMA, L. R. *et al.* Anti-acetylcholinesterase and toxicity against *Artemia salina* of

chitosan microparticles loaded with essential oils of *Cymbopogon flexuosus*, *Pelargonium x ssp* and *Copaifera officinalis*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 167, p. 1361–1370, jan. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.11.090>.

LUCCA, L. G. *et al.* Anti-inflammatory Effect from a Hydrogel Containing Nanoemulsified Copaiba oil (*Copaifera multijuga* Hayne). **AAPS PharmSciTech**, v. 19, n. 2, p. 522–530, ago. 2017. <https://doi.org/10.1208/s12249-017-0862-6>.

MALVAJERD, S. S. *et al.* Neuroprotective Potential of Curcumin-Loaded Nanostructured Lipid Carrier in an Animal Model of Alzheimer's Disease: Behavioral and Biochemical Evidence. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 69, n. 3, p. 671–686, 4 jun. 2019. <https://doi.org/10.3233/JAD-1900834>.

MANCONI, M. *et al.* Thymus essential oil extraction, characterization and incorporation in phospholipid vesicles for the antioxidant/antibacterial treatment of oral cavity diseases. **Colloids and surfaces. B, Biointerfaces**, v. 171, p. 115–122, nov. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2018.07.021>.

MARKOVA, E. *et al.* Design and evaluation of nanostructured lipid carriers loaded with *Salvia officinalis* extract for Alzheimer's disease treatment. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**, 12 jan. 2022. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.35006>.

MASIERO, J. F. *et al.* Vegetable oils in pharmaceutical and cosmetic lipid-based nanocarriers preparations. **Industrial Crops and Products**, v. 170, p. 113838, out. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2021.113838>.

MATTSON, M. P. Pathways towards and away from Alzheimer's disease. **Nature**, v. 430, n. 7000, p. 631–639, 2004. <https://doi.org/10.1038/nature02621>.

MORAES, A. R. *et al.* Effects of nanoemulsions prepared with essential oils of copaiba- and andiroba against *Leishmania infantum* and *Leishmania amazonensis* infections. **Experimental Parasitology**, v. 187, p. 12–21, 1 abr. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2018.03.005>.

MÜLLER, R. H.; RADTKE, M.; WISSING, S. A. Solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic and dermatological preparations. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 54, p. S131–S155, nov. 2002. [https://doi.org/10.1016/s0169-409x\(02\)00118-7](https://doi.org/10.1016/s0169-409x(02)00118-7).

MULLER, R. H.; SHEGOKAR, R.; KECK, C. M. 20 Years of Lipid Nanoparticles (SLN & NLC): Present State of Development & Industrial Applications. **Current Drug Discovery Technologies**, v. 8, n. 3, p. 207–227, set. 2011. <https://doi.org/10.2174/157016311796799062>.

MUSIELAK, E.; FELICZAK-GUZIŁ, A.; NOWAK, I. Synthesis and Potential Applications of Lipid Nanoparticles in Medicine. **Materials**, v. 15, n. 2, p. 682, jan. 2022. <https://doi.org/10.3390/ma15020682>.

PAIXÃO, V. L.; FREIRE DE CARVALHO, J. Essential oil therapy in rheumatic

diseases: A systematic review. **Complementary Therapies in Clinical Practice**, v. 43, p. 101391, maio 2021. <https://doi.org/10.1016/j.ctcp.2021.101391>.

PAVITHRA, P. S.; MEHTA, A.; VERMA, R. S. Essential oils: from prevention to treatment of skin cancer. **Drug Discovery Today**, v. 24, n. 2, p. 644–655, fev. 2019. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2018.11.020>.

PLANT, R. M. *et al.* The Essentials of Essential Oils. **Advances in Pediatrics**, abr. 2019. <https://doi.org/10.1016/j.yapd.2019.03.005>.

PINHEIRO, R. G. R. *et al.* Quercetin lipid nanoparticles functionalized with transferrin for Alzheimer's disease. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 148, p. 105314, maio 2020. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2020.105314>.

POLJŠAK, N.; KOČEVAR GLAVAČ, N. Vegetable Butters and Oils as Therapeutically and Cosmetically Active Ingredients for Dermal Use: A Review of Clinical Studies. **Frontiers in Pharmacology**, v. 13, p. 868461, 2022. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.868461>.

POLJŠAK, N.; KREFT, S.; GLAVAČ, N. K. Vegetable butters and oils in skin wound healing: Scientific evidence for new opportunities in dermatology. **Phytotherapy Research**, v. 34, n. 2, p. 254–269, out. 2019. <https://doi.org/10.1002/ptr.6524>.

RAJU, M. *et al.* Berberine loaded nanostructured lipid carrier for Alzheimer's disease: Design, statistical optimization and enhanced in vivo performance. **Life Sciences**, v. 285, p. 119990, nov. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2021.119990>.

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, mar. 2019. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.10.003>.

RIBEIRO, L. N. M. *et al.* Functional Hybrid Nanoemulsions for Sumatriptan Intranasal Delivery. **Frontiers in Chemistry**, v. 8, nov. 2020. <https://doi.org/10.3389/fchem.2020.589503>.

RIBEIRO, L. N. M. *et al.* Nanocarriers From Natural Lipids With In Vitro Activity Against *Campylobacter jejuni*. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 10, 2021.

ROOTE, J.; PROKOP, A. How to Design a Genetic Mating Scheme: A Basic Training Package for *Drosophila* Genetics. **G3: Genes|Genomes|Genetics**, v. 3, n. 2, p. 353–358, fev. 2013. <https://doi.org/10.1534/g3.112.004820>.

SALJOUGHIAN, S. *et al.* The effects of food essential oils on cardiovascular diseases: A review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 58, n. 10, p. 1688–1705, jul. 2017. <https://doi.org/10.1080/10408398.2017.1279121>.

SARKAR, A. *et al.* Alzheimer's disease: the silver tsunami of the 21st century.

Neural Regeneration Research, v. 11, n. 5, p. 693, 2016. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.182680>.

SATTAYAKHOM, A.; WICHIT, S.; KOOMHIN, P. The Effects of Essential Oils on the Nervous System: A Scoping Review. **Molecules**, v. 28, n. 9, p. 3771–3771, abr. 2023. <https://doi.org/10.3390/molecules28093771>.

SHAMSUDDIN, N. A. M.; ZULFAKAR, M. H. Nanostructured Lipid Carriers for The Delivery of Natural Bioactive Compounds. **Current Drug Delivery**, v. 19, mar. 2022. <https://doi.org/10.2174/1567201819666220324094234>.

SHEHATA, M. K.; ISMAIL, A. A.; KAMEL, M. A. Nose to Brain Delivery of Astaxanthin–Loaded Nanostructured Lipid Carriers in Rat Model of Alzheimer's Disease: Preparation, in vitro and in vivo Evaluation. **International Journal of Nanomedicine**, v. Volume 18, p. 1631–1658, mar. 2023. <https://doi.org/10.2147/IJN.S402447>.

SILVA, A. G. *et al.* Application of the essential oil from copaiba (*Copaifera langsdorfi* Desf.) for acne vulgaris: a double-blind, placebo-controlled clinical trial. **Alternative Medicine Review: A Journal of Clinical Therapeutic**, v. 17, n. 1, p. 69–75, 2012. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22502624/>

SILVA, G. H. R. *et al.* Articaine in functional NLC show improved anesthesia and anti-inflammatory activity in zebrafish. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, 12 nov. 2020. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-76751-6>

SILVA, E. F. *et al.* Lipid nanoparticles based on natural matrices with activity against multidrug resistant bacterial species. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 13, p. 1328519, 2024. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2023.1328519>

SINGH, A.; IRVINE, K. D. Drosophila as a model for understanding development and disease. **Developmental Dynamics**, v. 241, n. 1, p. 1–2, 2011. <https://doi.org/10.1002/dvdy.23712>.

URASAKI, Y. *et al.* Fast-Acting and Receptor-Mediated Regulation of Neuronal Signaling Pathways by Copaiba Essential Oil. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 7, p. 2259–2259, 2020. <https://doi.org/10.3390/ijms21072259>.

VAZ, M.; SILVESTRE, S. Alzheimer's disease: Recent treatment strategies. **European Journal of Pharmacology**, v. 887, n. 1, p. 173554, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2020.173554>.

VEIGA JUNIOR, V. F.; PINTO, A. C. O gênero copaifera L. **Química Nova**, v. 25, n. 2, p. 273–286, 2002. <https://doi.org/10.1590/s0100-40422002000200016>.

VERMA, N. *et al.* Anti-Inflammatory Effects of Shea Butter through Inhibition of Inos, Cox-2, and Cytokines via the Nf-Kb Pathway in Lps-Activated J774 Macrophage Cells. **Journal of Complementary and Integrative Medicine**, v. 9, n. 1, p. 1–11, 2012. <https://doi.org/10.1515/1553-3840.1574>.

VIGAN, M. Essential oils: renewal of interest and toxicity. **European journal of dermatology: EJD**, v. 20, n. 6, p. 685–692, 2010. <https://doi.org/10.1684/ejd.2010.1066>.

WANG, Z.-J.; HEINBOCKEL, T. Essential Oils and Their Constituents Targeting the GABAergic System and Sodium Channels as Treatment of Neurological Diseases. **Molecules**, v. 23, n. 5, p. 1061, maio 2018. <https://doi.org/10.3390/molecules23051061>.

WILLIAMSON, J.; GOLDMAN, J.; MARDER, K. S. Genetic Aspects of Alzheimer Disease. **The Neurologist**, v. 15, n. 2, p. 80–86, 2009. <https://doi.org/10.1097/NRL.0b013e318187e76b>.

YAMAGUCHI, M.; YOSHIDA, H. Drosophila as a Model Organism. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 1076, n. 216, p. 1–10, 2018. https://doi.org/10.1007/978-981-13-0529-0_1.

ZHANG, L. *et al.* The strategies and techniques of drug discovery from natural products. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 216, p. 107686, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2020.107686>.

ZHOU, P. *et al.* Evaluation of the Mechanism of Action of Rosemary Volatile Oil in the Treatment of Alzheimer's Disease Using Gas Chromatography -mass Spectrometry Analysis and Network Pharmacology. **Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening**, v. 26, n. 13, p. 2321–2332, 2023. <https://doi.org/10.2174/1386207325666220930091758>.

Capítulo II

**Carreadores Lipídicos Nanoestruturados que encapsulam óleos essenciais
como potencial tratamento contra Alzheimer em modelo de *Drosophila
melanogaster***

RESUMO

A doença de Alzheimer (DA) é caracterizada pelo acúmulo de placas de proteínas beta amiloide (A β), emaranhados de proteína tau e neurodegeneração. São poucos os medicamentos aprovados para o tratamento da DA e nenhum deles promove a sua cura, além de causar diversos efeitos colaterais sistêmicos. Os óleos essenciais (OE) têm diversas propriedades farmacológicas interessantes para o desenvolvimento de drogas, mas apresentam limitações físico-químicas (hidrofobicidade, fotossensibilidade, instabilidade e alta volatilidade) que podem ser melhoradas por meio da nanoencapsulação. Dentre os sistemas nanocarreadores, os carreadores lipídicos nanoestruturados (NLC) são muito promissores na entrega de OE, sendo estáveis, biocompatíveis, aumentam a biodisponibilidade de ativos hidrofóbicos, reduzindo a toxicidade. O objetivo deste trabalho foi desenvolver formulações de NLC que encapsulam OE e avaliá-las quanto a sua estabilidade físico-química, nanotoxicidade e atividade antineurodegenerativa, através do uso do modelo biológico alternativo de *Drosophila melanogaster*. Os NLC foram preparados com manteiga vegetal (karité) e óleo essencial (copaíba ou olíbano) compondo a fase lipídica e poloxamer 188 como surfactante na fase aquosa. Eles foram avaliados quanto à estabilidade físico-química por meio do tamanho de partículas (nm), índice de polidispersão (PDI) e potencial Zetal (mV), durante 365 dias, a 25 °C (n=3). As formulações foram estáveis por 365 dias a 25 °C e apresentaram distribuição de tamanho de partícula homogênea. Os OE contribuíram para redução dos tamanhos de partículas e para maior homogeneidade, confirmando seu papel também estrutural nos NLC. Foram determinadas concentrações de NLC seguras e efetivas para a sobrevivência das moscas. As formulações apresentaram atividade antineurodegenerativa, reduzindo o acúmulo da proteína A β e morte neuronal na medula do lobo óptico das moscas. Mesmo o NLC controle (sem OE) foi capaz de reduzir a degeneração, demonstrando a bioatividade da manteiga de

karité. Este trabalho foi pioneiro em desenvolver NLC carreando OE de copaíba e olíbano para o tratamento do Alzheimer. Testes futuros deverão ser conduzidos em modelos biológicos mais complexos para assegurar ainda mais a segurança e eficácia destes sistemas promissores para o tratamento da DA.

Palavras-chave: nanopartículas lipídicas; lipídios naturais; manteiga vegetal; atividade antineurodegenerativa; atividade anti-Alzheimer.

ABSTRACT

The Alzheimer disease (AD) is characterized by the accumulation of amyloid beta (A β) protein plaques, tau protein tangles and neurodegeneration. There are a few approved drugs for the AD treatment and none of them promotes the cure, in addition to cause several systemic side effects. Essential oils (EO) have several interesting pharmacological properties for drug development, but they present physicochemical limitations (hydrophobicity, photosensitivity, instability and high volatility) that can be improved through nanoencapsulation. Among the nanocarriers systems, nanostructured lipid carriers (NLC) are very promising in the EO delivery, being stable, biocompatible, increase the bioavailability, reducing the toxicity. The objective of this work was the development of NLC formulations encapsulating EO. NLC were based on vegetable butter (shea) and essential oils (copaiba or frankincense) as the lipid phase and poloxamer 188 as a surfactant in the aqueous phase. They were evaluated for physicochemical stability in terms of size (nm), polydispersity index (PDI) and Zeta potential (mV), for 365 days at 25 °C (n=3). The formulations were stable for 365 days at 25 °C and have showed homogeneous particle size distribution and expected average sizes. EO have contributed to reducing particle sizes, also confirming their structural role in NLC. The safe and effective NLC concentrations were determined for *D. melanogaster*. The formulations have showed anti-neurodegenerative activity, reducing the accumulation of A β protein and neuronal death in the optic lobe medulla of flies. Even the NLC control (without EO) was able to reduce degeneration, demonstrating the bioactivity of

shea butter. This work was a pioneer in developing NLC carrying copaiba and frankincense EO for the Alzheimer treatment. Further assays should be conducted on more complex biological models, in order to ensure the safety and efficacy of these promising systems for the treatment of AD.

Key words: lipid nanoparticles; natural lipids; vegetable butter; antineurodegenerative activity; anti-Alzheimer activity.

1 INTRODUÇÃO

Os avanços na área da saúde têm possibilitado que as pessoas vivam por mais tempo, levando ao envelhecimento da população (DESHPANDE, GOGIA & SINGH, 2019). Esse aumento da expectativa de vida somado a um estilo de vida mais estressante, provocou um aumento na incidência de doenças neurodegenerativas, como a doença de Alzheimer (DA) (DESHPANDE, GOGIA & SINGH, 2019).

A DA é uma patologia que se agrava com tempo, e é caracterizada por aglomerados de proteínas beta amiloide (A β) fora dos neurônios, acúmulo de proteína tau dentro deles e neurodegeneração (ALZHEIMER'S ASSOCIATION, 2023). A doença é mais prevalente em pessoas com 65 anos ou mais, e além da idade, a genética e histórico familiar também são fatores de risco (ALZHEIMER'S ASSOCIATION, 2023). A DA é uma das causas de demência, uma condição que abrange um conjunto de sintomas, como problemas de memória, linguagem, resolução de problemas, entre outras capacidades cognitivas (ALZHEIMER'S ASSOCIATION, 2023).

São poucos os medicamentos aprovados para o tratamento da DA e nenhum deles promove a sua cura (KIM *et al.*, 2022; ALZHEIMER'S ASSOCIATION, 2023; KHAN *et al.*, 2023). Dessa forma, é muito importante o desenvolvimento de novas drogas com a capacidade de impedir o avanço da doença (CUMMINGS, MORSTORF & ZHONG, 2014; VAZ & SILVESTRE, 2020).

Os produtos naturais apresentam potencial terapêutico no tratamento de doenças neurodegenerativas, como a DA (NOORI *et al.*, 2021). Compostos baseados em plantas têm sido estudados como novas drogas por apresentarem diversos efeitos terapêuticos e causarem menos efeitos adversos (FIRDAUS & SINGH, 2021). Muitas deles podem ser utilizados para diminuir sintomas de demência e DA (BUI & NGUYEN, 2017).

Os óleos essenciais (OE) são líquidos voláteis extraídos de plantas aromáticas. A extração ocorre por meio de destilação ou extração mecânica, métodos físicos que evaporam em temperatura ambiente sem causar danos (BRASIL, 2019; PDQ, 2023). Os OE possuem diversas propriedades

farmacológicas, que propiciam sua utilização no desenvolvimento de novas drogas (SOUSA *et al.*, 2023). Mas, por apresentarem limitações físico-químicas (hidrofobicidade, instabilidade e alta volatilidade), a nanoencapsulação deles é aconselhada, pois permite a melhora de tais parâmetros. (BILIA *et al.*, 2014; CARBONE *et al.*, 2018; CIMINO *et al.*, 2021).

Dentre os sistemas nanocarreadores, os carreadores lipídicos nanoestruturados (NLC) são muito promissores para a entrega de OE para aplicações multiterapêuticas (CIMINO *et al.*, 2021). Eles são sistemas estáveis, biocompatíveis, de baixo custo de produção, altamente escalonáveis e melhoram a biodisponibilidade de ativos, reduzindo sua toxicidade (MUSIELAK, FELICZAK-GUZIŁ & NOWAK, 2022).

O invertebrado *Drosophila melanogaster*, conhecido como “mosca da fruta”, é um excelente organismo modelo para o estudo de doenças neurodegenerativas, como a DA (LENZ, *et al.* 2013; McGURK, BERSON & BONINI, 2015). Esse modelo possibilita a investigação de novos candidatos terapêuticos que reduzam a formação de placas de proteína A β , diminuindo a degeneração neural (CARMINE-SIMMEN *et al.* 2009; HARDY & SELOKOE 2002; DESHPANDE, GOGIA & SINGH, 2019; ALZHEIMER'S ASSOCIATION 2020).

O objetivo deste trabalho foi desenvolver formulações de NLC que encapsulam OE de copaíba e olíbano, e avalia-las quanto à estabilidade físico-química a longo prazo, nanotoxicidade e atividade antineurodegenerativa, usando como modelo *D. melanogaster*, para que se possa avançar na busca de potenciais candidatos para o tratamento da DA.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Área de trabalho

A pesquisa foi desenvolvida no Laboratório de Nanobiotecnologia (NANO BIO) e no, Laboratório de Genética (LABGEN) do Instituto de Biotecnologia da Universidade Federal de Uberlândia (UFU), e no Laboratório de Patologia Oral, da Faculdade de Odontologia da UFU. A manutenção das moscas e a execução dos experimentos seguiram normas e condições experimentais estabelecidas e padronizadas.

2.2 Materiais

A manteiga de karité, OE de copaíba e olíbano foram adquiridos comercialmente da empresa Engetec/Engenharia das Essências®. O poloxamer (Kolliphor® P188) utilizado como surfactante foi obtido da empresa Sigma-Aldrich, USA. E a água deionizada (18 MΩ) foi obtida a partir de um purificador de água ultra-pura Milli-Q® Direct 8.

2.3 Preparo das formulações de carreadores lipídicos nanoestruturados que encapsulam óleo essencial de copaíba (NLC/COPA) e olíbano (NLC/OLI)

Foi utilizado o método de emulsificação-ultrasonicação para o desenvolvimento das diferentes formulações de NLC (controle), NLC/COPA (óleo essencial de copaíba a 0,001 %) e NLC/OLI (óleo essencial de olíbano a 0,005 %). A fase lipídica foi composta por manteiga de karité a 10 % (m/v) (lipídio sólido) e óleos essenciais (lipídios líquidos) (0,001-0,005 %, m/v) aquecida em banho-maria a 47 °C. Simultaneamente, a fase aquosa composta por poloxamer (5 %, m/v) foi aquecida na mesma temperatura da fase lipídica. Para a formação da pré-emulsão, a fase aquosa foi gotejada à fase lipídica, sob agitação de 10000 rpm, por 2 min, em agitador Ultra-Turrax (Ultra-turrax® T18). A microemulsão resultante foi sonicada por 15 min. Ao término desta etapa, a nanoemulsão formada foi arrefecida em banho de gelo, até alcançar 25 °C, a fim de solidificar as nanopartículas formadas. Todas as formulações de NLC, NLC/COPA e NLC/OLI foram preparadas com êxito, apresentando aspecto leitoso, conforme o esperado. Todos os sistemas foram armazenados a 25 °C até uso subsequente (RIBEIRO *et al.*, 2021).

2.4 Caracterização e acompanhamento da estabilidade físico-química das formulações

As medidas de tamanho de partícula (nm), índice de polidispersão (PDI) e potencial Zeta (mV) foram realizadas pela técnica de espalhamento dinâmico de

luz (DLS), através do equipamento LiteSizer 500 (Anton Paar). Tais parâmetros foram monitorados durante 365 dias, a 25 °C (RIBEIRO *et al.*, 2017). Os testes estatísticos ANOVA e Tukey *post test* foram empregados para avaliar alterações significativas intragrupo ao longo do tempo de monitoramento ($\sigma = 95 \%$).

2.5 Morfologia das nanopartículas

A morfologia das formulações de NLC, NLC/COPA e NLC/OLI foram reveladas pela técnica de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). Uma gota de cada amostra foi aderida a uma lamínula de vidro previamente pregada a um *stub* de alumínio. Após a completa evaporação do solvente, os *stubs* foram submetidos ao processo de *sputtering* durante 120 s a 30 kV. Logo após, as amostras foram visualizadas em MEV Zeiss EVO MA10 com detectores de elétrons secundários e retroespalhados, operando em alto vácuo sob tensão de 20 kV (RIBEIRO *et al.*, 2021).

2.6 Estoque de moscas

As linhagens GMR-GAL4 ($w[*]$; $P\{w[+mC]=GAL4-ninaE.GMR\}$ 12 - número de estoque 1104), UAS-A β ($w[*]$; $PBac\{y[+mDint2] \ w[+mC]=UAS-A\beta.1-42\}$ VK00033 – BL#64216) e w^{1118} ($w[1118]$ – BL#3605), foram adquiridas do *Bloomington Stock Center* da Universidade de Indiana, Estados Unidos. Elas foram mantidas em frascos contendo ¼ de meio de cultura Bloomington (0,01% de farinha de soja; 0,073% de fubá de milho; 0,018% de levedura, 0,06% de ágar; 0,077% de xarope de glicose, 0,05% de solução de ácida e 0,06% de solução de Nipagin) em incubadora BOD (Demanda Bioquímica de Oxigênio, SOLAB) a 25 °C, 70 % de umidade relativa e ciclo claro-escuro de 12:12 horas (BATISTA *et al.*, 2021).

2.7 Ensaio de nanotoxicidade in vivo em modelo de *Drosophila melanogaster*

As concentrações de cada composto foram determinadas com base no IC₅₀ (concentração inibitória média) encontrados para os OE, a partir do qual foram

realizadas diluições seriadas de concentrações acima e abaixo dele. O IC₅₀ considerado foi 0,01663 mg/mL para o OE de copaíba (LIMA *et al.*, 2021) e 0,0671 mg/mL para o OE de olíbano (KOHOUDE *et al.*, 2017). Na produção da formulação notou-se que a massa de OE de copaíba era muito pequena para ser pesada, então foi adaptado o valor mais próximo possível para pesagem, que foi a concentração de 0,023 mg/mL.

Moscas da linhagem w¹¹¹⁸ (3605), foram submetidas ao ensaio de nanotoxicidade. As moscas foram alocadas em frascos (tubo de acrílico transparente) individuais contendo 1 g de purê de batata enriquecido (75 % purê de batata instantâneo, 15 % extrato de levedura, 9,3 % glicose e 0,07 % Nipagin®) (MALTA *et al.*, 2022) suplementado com 2,5 mL de EM/COPA, NLC/COPA e NLC nas concentrações 0,046 mg/mL, 0,023 mg/mL, 0,0115 mg/mL, 0,00575 mg/mL e com EM/OLI, NLC/OLI e NLC nas concentrações 0,2706 mg/mL, 0,1353 mg/mL, 0,0676 mg/mL, 0,0338 mg/mL e 0,0169 mg/mL.

O Controle negativo (NT) foi preparado com purê de batata diluído em água e o veículo, em purê de batata enriquecido diluído em solução de P188 em água nas concentrações correspondentes às aquelas de tratamento.

Em cada frasco foram colocadas 30 moscas adultas (15 machos e 15 fêmeas) e cada grupo de tratamento foi testado em triplicata. Os frascos foram mantidos em estufa à temperatura de 25 °C por 21 dias, sendo o meio trocado 3 vezes por semana. A curva de nanotoxicidade foi obtida pela contagem do número de indivíduos mortos em cada troca de meio.

2.8 Avaliação da Taxa de Eclosão

Concomitantemente ao ensaio de nanotoxicidade, foi avaliada a taxa de eclosão, armazenando os frascos da primeira troca de meio do teste de toxicidade, após transferência das moscas, para acompanhar o seu processo de metamorfose. A taxa de eclosão foi calculada a partir da contagem de pupas (contagem após 7 a 9 dias do início do tratamento) e adultos (contagem após 12 dias do início do tratamento) gerados a partir da oviposição das 30 moscas adultas (15 machos e 15 fêmeas) tratadas. A taxa de eclosão foi calculada adotando-se o número de pupas como 100 % em relação ao número de adultos eclodidos (RODRIGUES *et al.*, 2021).

2.9 Avaliação da atividade antineurodegenerativa

Neste estudo, GMR-GAL4 (linhagem *driver*) direciona a expressão da proteína beta amiloide (UAS-A β , linhagem *responder*) para os olhos compostos da mosca. O cruzamento de fêmeas UAS-A β e machos GMR-GAL4 resulta em neurodegeneração da retina e lobo óptico da mosca adulta (DESHPANDE, GOGIA & SINGH, 2019).

Ovos da progênie de GMR-GAL4;UAS-A β foram coletados em frascos de oviposição contendo meio de cultura à base de ágar (4 % p/v) e levedura suplementada com sacarose. Os ovos foram então colocados em frascos de poliestireno transparente (94 x 25 mm) contendo meio purê de batata Yoki® (1 g) suplementado com as formulações (2,5 mL), garantindo que as moscas se alimentassem dos meios de tratamento desde o primeiro estágio larval. O controle negativo (NT) foi composto por larvas tratadas com o purê de batata preparado em água (RODRIGUES *et al.*, 2021). Dessa mesma forma foram tratados os controles GMR-Gal4 x w¹¹¹⁸ e w¹¹¹⁸ x UAS-A β , linhagens sem neurodegeneração no olho.

As concentrações selecionadas para a avaliação da atividade antineurodegenerativa foram definidas a partir dos resultados obtidos na taxa de sobrevivência e eclosão das moscas. Foram testadas em moscas transgênicas GMR-GAL4;UAS-A β de *D. melanogaster*, as formulações EM/COPA, NLC/COPA e NLC nas concentrações 0,023 mg/mL e 0,0115 mg/mL e as formulações EM/OLI, NLC/OLI e NLC nas concentrações 0,2706 mg/mL e 0,1353 mg/mL. Foram avaliadas alterações histopatológicas na medula do lobo óptico de moscas adultas recém-eclodidas (0-2 dias pós eclosão) após suplementação com as formulações.

2.10 Análise Histológica

Para análise histológica, moscas adultas recém-eclodidas (0-2 dias) foram coletadas, anestesiadas com éter etílico, fixadas em solução de Carnoy (6:3:1, etanol 99 %, clorofórmio e ácido acético glacial) por 24 horas e processadas em

álcool etílico 70 % (2x), álcool etílico 80 % (2x), álcool etílico 90 % (2x), álcool etílico absoluto (2x), xilol (2x), parafina líquida 60 % (2x) por 15 minutos em cada repetição. As cabeças das moscas foram alinhadas e embebidas em parafina. Os blocos foram seccionados com 3 µm de espessura utilizando um micrótomo semiautomático (SLEE CUT5062). Os cortes foram desidratados, corados com hematoxilina e eosina e montados (SANTOS *et al.*, 2024). As imagens foram capturadas em microscópio de luz (*Leica*) com ampliação de 40 ou 100x, através de sistema acoplado de captura de imagens (software LAS EZ). A análise histopatológica da medula (lobo óptico) de três ou mais moscas adultas foi utilizada para calcular o índice de neurodegeneração como normal a baixo, moderado ou grave, de acordo com as lesões vacuolares encontradas.

2.11 Coloração com vermelho Congo

A coloração com vermelho Congo foi realizada para detectar as placas amiloides na retina das moscas. As secções embebidas em parafina descritas anteriormente foram desparafinizadas, hidratadas e coradas com hematoxilina durante 2 minutos. As lâminas foram lavadas em água corrente, banhadas 1x em água destilada, 1x em álcool etílico 80 %, incubadas em solução alcalina por 20 minutos e em solução alcalina/vermelho Congo por 60 minutos. Por fim, as secções foram desidratadas (3 banhos em álcool etílico absoluto seguidos de 3 banhos em xilol), secas e montadas. As lâminas foram analisadas sob luz polarizada em microscópio (Nikon Eclipse Ti-S).

2.12 Análises estatísticas

Para as análises estatísticas foi utilizado o software GraphPad Prism versão 8.0.2. Para a taxa de eclosão foi avaliada a distribuição dos dados como paramétrica ou não paramétrica pelos testes de D'Agostino e Pearson, Anderson-Darling e Kolmogorov-Smirnov. Os grupos foram comparados por meio do teste Geharn-Breslow-Wilcoxon (ensaio de nanotoxicidade) e do teste de Kruskal-Wallis (taxa de eclosão), com nível de significância estabelecido de $p < 0,05$.

3 RESULTADOS

3.1 Caracterização estrutural e estabilidade físico-química das formulações

Na caracterização estrutural inicial, as formulações demonstraram propriedades estruturais desejáveis em todas as amostras. Os tamanhos de partículas médios obtidos foram de $311,13 \pm 6,2$ nm para NLC, de $298,1 \pm 0,99$ nm para NLC/COPA e $307,7 \pm 3,1$ nm para NLC/OLI. Em relação aos valores médios de polidispersão (PDI) obtidos, NLC apresentou valor médio de $0,166 \pm 0,02$, NLC/COPA exibiu valor de $0,196 \pm 0,02$ e NLC/OLI de $0,155 \pm 0,01$. Todas as formulações apresentaram distribuição de tamanho de partícula homogênea e tamanhos médios esperados. Finalmente, as formulações de NLC, NLC/COPA e NLC/OLI apresentaram valores de potencial Zeta médios iniciais de $-33,1 \pm 0,4$ mV, $-33,5 \pm 0,27$ mV e $-33,0 \pm 0,25$ mV, respectivamente. Todas as formulações desenvolvidas foram inspecionadas visualmente, apresentando-se homogêneas, líquidas e esbranquiçadas, mesmo após 1 ano de monitoramento.

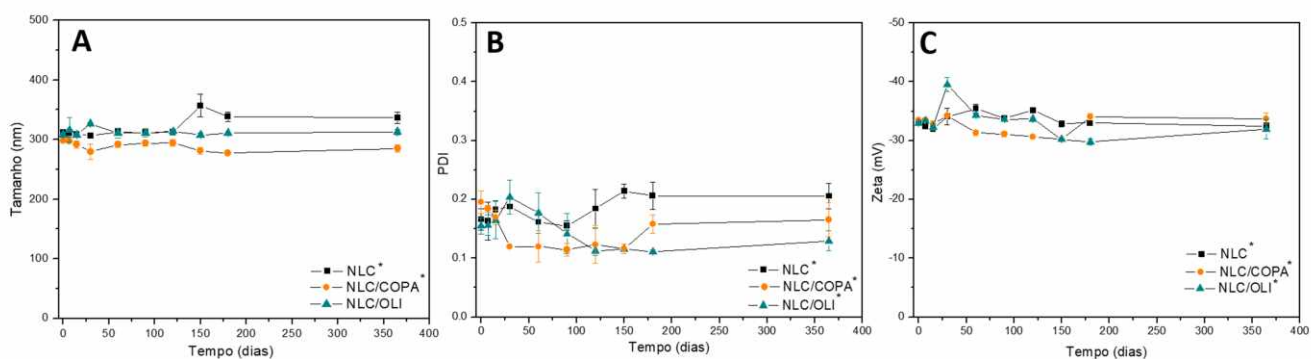


Figura 1. Estabilidade físico-química das formulações NLC em termos de tamanho (A), PDI (B) e potencial Zeta (C), ao longo de 180 dias à 25 °C. NLC: Carreador lipídico nanoestruturado controle (sem óleo essencial). NLC/COPA: Carreador lipídico nanoestruturado com óleo essencial de copaíba. NLC/OLI: Carreador lipídico nanoestruturado com óleo essencial de olibano. One way ANOVA/Tukey foram usados para analisar diferenças estatísticas intragrupo; * $p < 0,05$.

A Figura 1.A descreve o acompanhamento dos tamanhos de partículas de todas as amostras, garantindo o seu tempo de prateleira mínimo de 12 meses à

temperatura ambiente. Após 365 dias, os tamanhos médios de partículas foram de $336,6 \pm 9,9$ nm, $285,2 \pm 5,9$ nm e $312,9 \pm 4,6$ nm para NLC, NLC/COPA e NLC/OLI, respectivamente. NLC/OLI foi a única formulação que não apresentou diferença estatisticamente significativa na análise intragrupo ao longo do tempo ($p > 0,05$). A Figura 1.B exibe os valores de PDI durante os 365 dias de análise (25°C). Foram detectadas diferenças estatisticamente significativas entre os valores de PDI em todas as formulações em função do tempo ($p < 0,05$). No final do estudo, os valores de PDI exibidos foram de $0,206 \pm 0,002$, $0,165 \pm 0,003$ e $0,129 \pm 0,002$ para NLC, NLC/COPA e NLC/OLI, respectivamente. Na análise dos valores de potencial Zeta ao longo do tempo (Figura 1.C), foi evidenciada diferença significativa em todos os grupos ($p < 0,05$). As formulações exibiram valor médio de $-32,5 \pm 0,4$ para NLC, de $-33,7 \pm 1,0$ para NLC/COPA e de $-32,0 \pm 1,6$ para NLC/OLI.

3.2 Morfologia das nanopartículas

A Figura 2 mostra a análise em microscopia eletrônica de varredura de NLC (A), NLC/COPA (B) e NLC/OLI (C), confirmando a morfologia esférica de contornos bem definidos e distribuição homogênea.

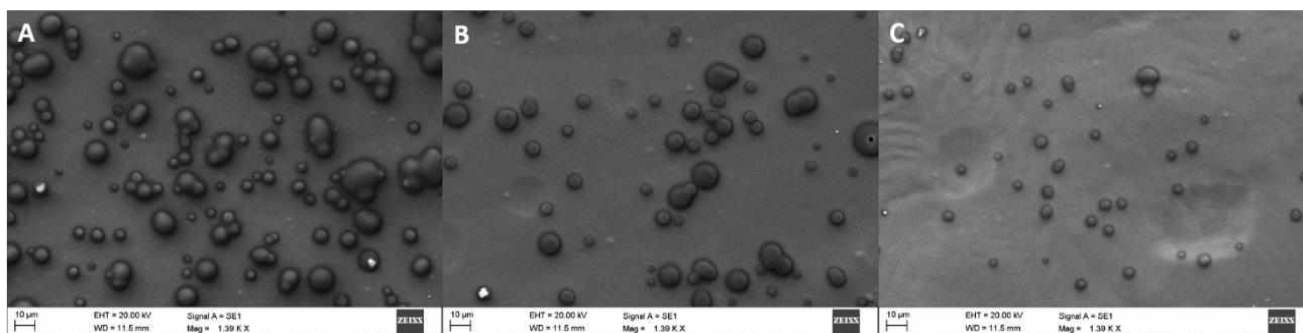


Figura 2. Imagens de MEV das formulações (A) NLC, (B) NLC/COPA e (C) NLC/OLI. NLC: Carreador lipídico nanoestruturado controle, sem óleo essencial. NLC/COPA: Carreador lipídico nanoestruturado com óleo essencial de copaíba olíbano. NLC/OLI: Carreador lipídico nanoestruturado com óleo essencial de olíbano.

3.3 Ensaio de nanotoxicidade

As moscas apresentaram taxas de sobrevivência sem diferença significativa na maioria dos tratamentos de copaíba em relação ao grupo não tratado (NT). Nas formulações de copaíba (Figura 3), a EM/COPA na concentração 0,023 mg/mL foi significativamente melhor ($p < 0,05$, teste Geharn-Breslow-Wilcoxon) do que o grupo não tratado (NT, água). Já a EM/COPA 0,00575 mg/mL e P188 correspondente às formulações de copaíba a 0,046 mg/mL, tiveram o percentual de sobrevivência significativamente menores quando comparados ao grupo NT ($p < 0,05$ e $p < 0,01$ respectivamente, teste Geharn-Breslow-Wilcoxon). Os demais grupos de tratamento se apresentaram iguais ao grupo NT, não apresentando nanotoxicidade para a sobrevivência das moscas.

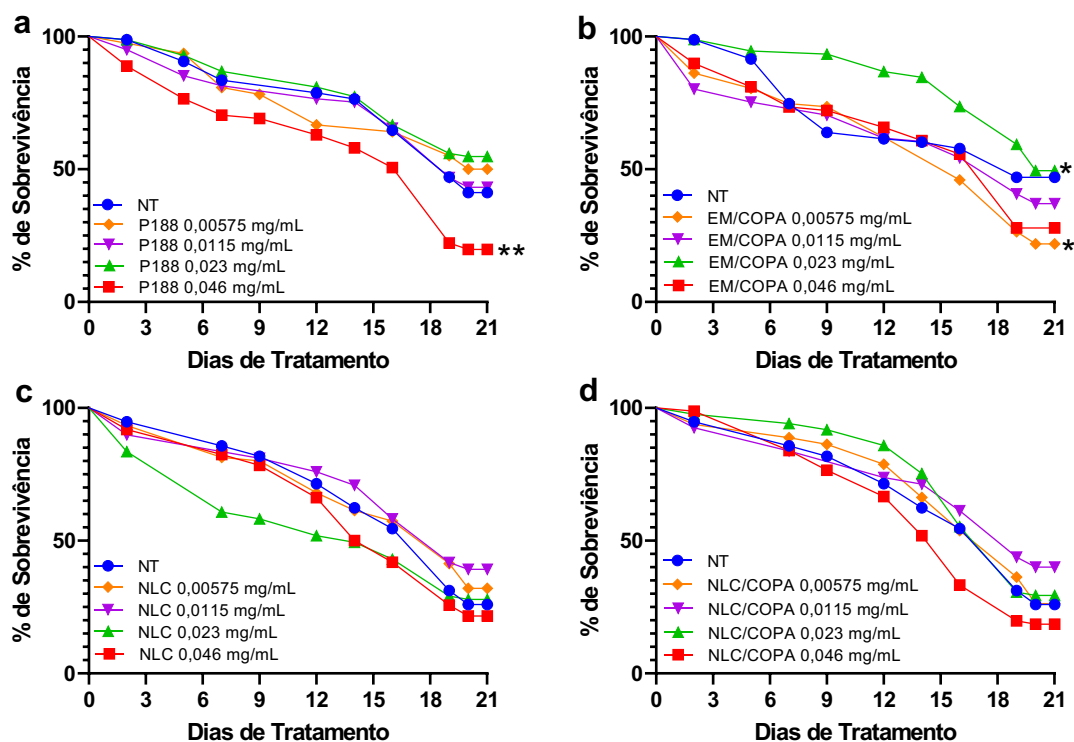


Figura 3. Teste de nanotoxicidade em relação ao percentual de sobrevivência das moscas (w^{1118}) tratadas com as formulações de NLC, (a) P188, (b) EM/COPA (c), NLC (d), NLC/COPA. NT: Não Tratado. P188: solução de Poloxamer 188 em água. EM/COPA: Emulsão de óleo essencial de copaíba. NLC: Carreador lipídico nanoestruturado controle (sem óleo essencial). NLC/COPA: Carreador lipídico nanoestruturado com óleo essencial de copaíba. A significância estatística é indicada como * para $p < 0,05$, ** para $p < 0,01$ (teste Geharn-Breslow-Wilcoxon).

Com relação às moscas tratadas com olíbano (Figura 4), o grupo tratado com EM/OLI 0,0169 mg/mL apresentou taxa de sobrevivência significativamente maior do que o grupo NT. Já os grupos tratados com NLC/OLI 0,0169 mg/mL e P188 correspondente às formulações de copaíba a 0,046 mg/mL, apresentaram percentual de sobrevivência menor que o grupo NT ($p < 0,01$ e $p < 0,05$ respectivamente, teste Geharn-Breslow-Wilcoxon). As demais concentrações das formulações e controles se apresentaram iguais ao NT.

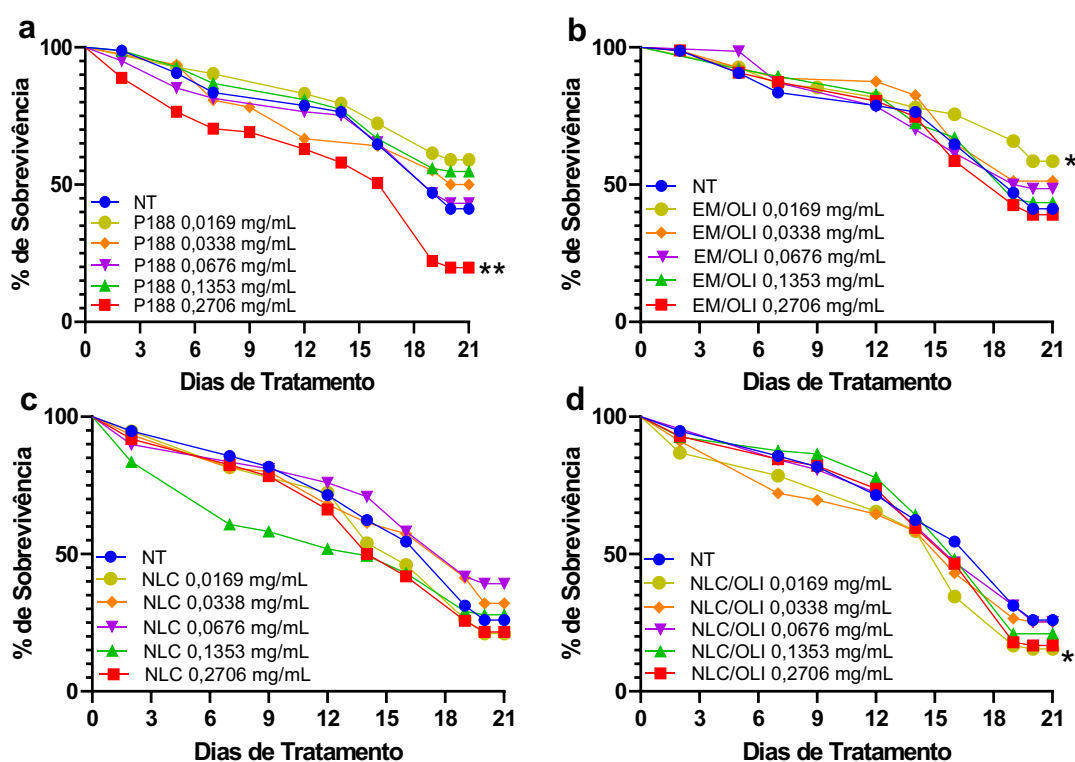


Figura 4. Teste de nanotoxicidade em relação ao percentual de sobrevivência das moscas (*w*¹¹¹⁸) tratadas com as formulações de NLC, (a) P188, (b) EM/OLI, (c) NLC e (d) NLC/OLI. NT: Não Tratado. P188: solução de poloxamer 188. EM/OLI: Emulsão de óleo essencial de olíbano. NLC: Carreador lipídico nanoestruturado controle (sem óleo essencial). NLC/OLI: Carreador lipídico nanoestruturado com óleo essencial de olíbano. A significância estatística é indicada como * para $p < 0,05$, ** para $p < 0,01$ (teste Geharn-Breslow-Wilcoxon).

3.4 Avaliação da taxa de eclosão

Em relação as taxas de eclosão das moscas, nenhum dos grupos tratados apresentou diferença significativa quando comparado ao NT (Figuras 5 e 6).

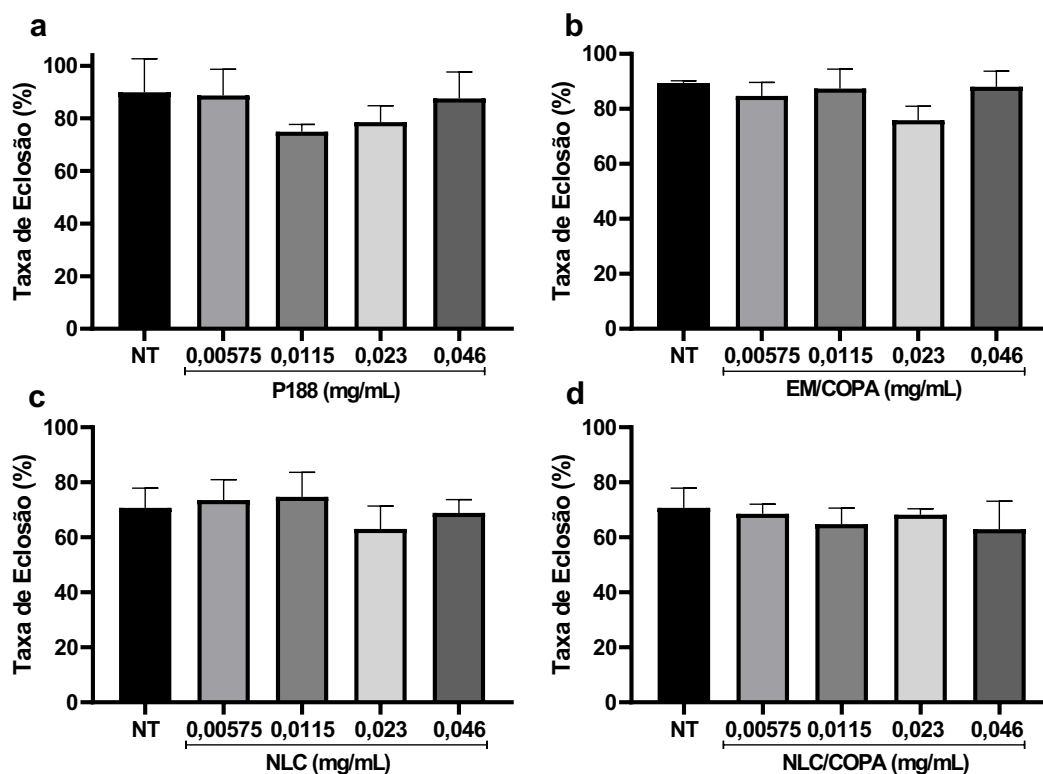


Figura 5. Taxa de eclosão das moscas (w^{1118}) tratadas com as formulações de óleo essencial de copaíba e formulações controle. (a) P188, (b) EM/COPA, (c) NLC e (d) NLC/COPA. NT: Não Tratado. P188: solução P de poloxamer 188. EM/COPA: Emulsão de óleo essencial de copaíba, NLC: Carreador lipídico nanoestruturado controle, sem óleo essencial e NLC/COPA: Carreador lipídico nanoestruturado com óleo essencial de copaíba.

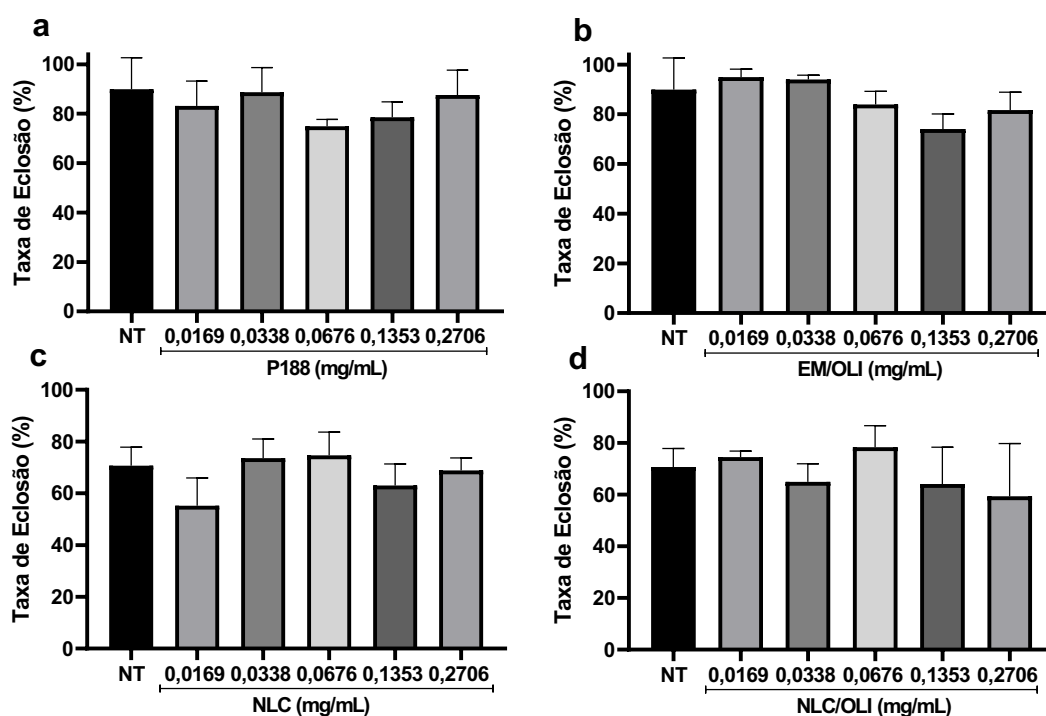


Figura 6. Taxa de eclosão das moscas (w^{1118}) tratadas com as formulações de óleo essencial de olíbano e formulações controle. (a) P188, (b) EM/OLI, (c) NLC e (d) NLC/OLI. NT: Não Tratado. P188: solução de poloxamer 188. EM/OLI: Emulsão de óleo essencial de olíbano. NLC: Carreador lipídico nanoestruturado controle, sem óleo essencial. NLC/OLI: Carreador lipídico nanoestruturado com óleo essencial de olíbano.

3.5 Avaliação da atividade Antineurodegenerativa

Quanto à neurodegeneração da medula do lobo óptico das moscas, todos os grupos de tratamento apresentaram ação antineurodegenerativa quando comparados ao grupo não-tratado ($p < 0,05$, teste de *Mann Whitney*) (Figuras 7 e 8).

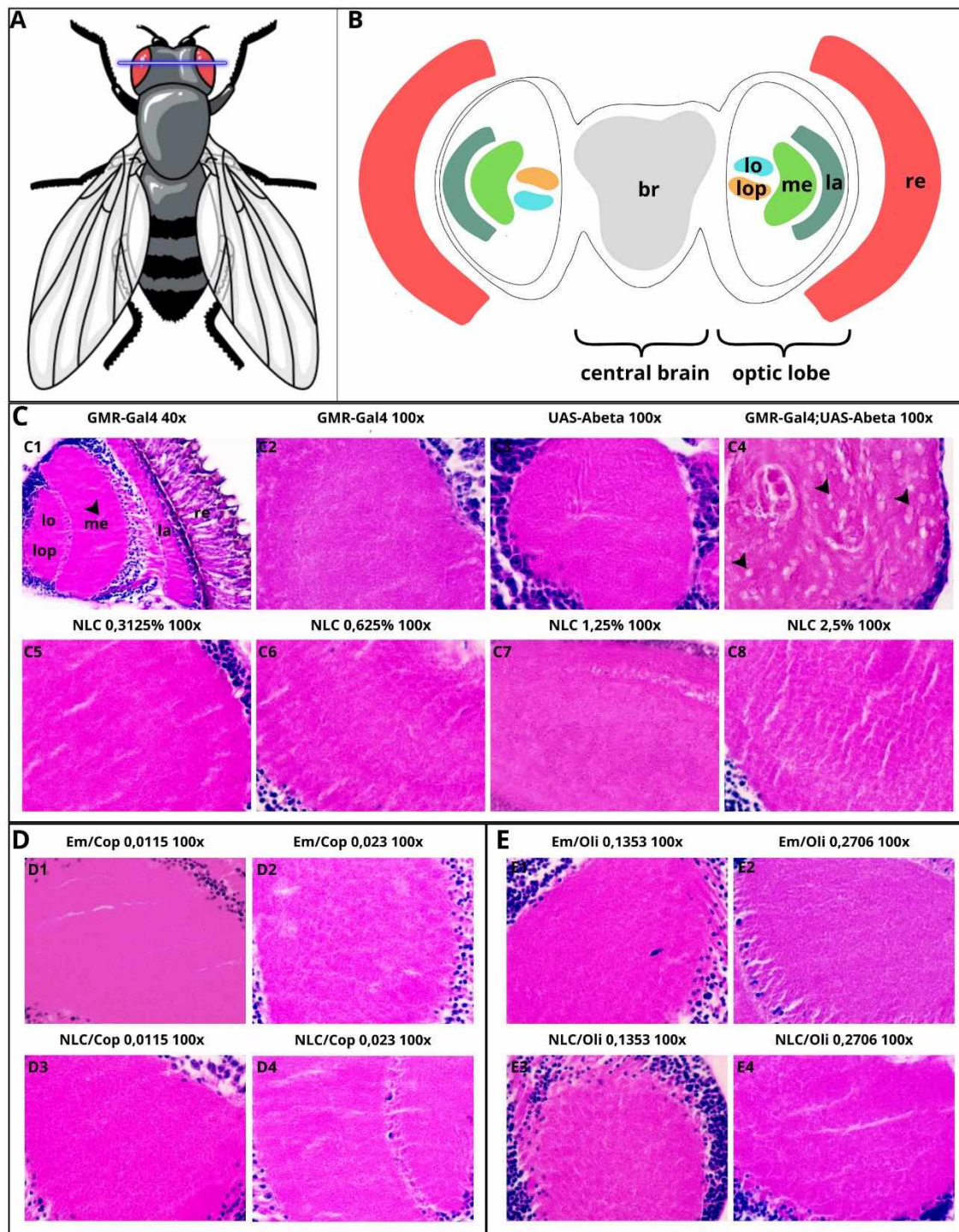


Figura 7. Histologia do lobo óptico de moscas de linhagens controle (GMR-Gal4; w^{1118} e w^{1118} ;UAS-A β) e linhagem GMR-Gal4;UAS-A β não tratadas e tratadas com formulações controle e formulações de óleo essencial. A= Esquema mostrando a direção da secção histológica da cabeça da mosca. B= Secção transversal da cabeça da mosca indicando as diferentes partes do sistema visual: olho, lâmina (la), medula (me), lobo (lo), placa lobular (lop). Seções

representativas de parafina de 3 μ m do lobo óptico das moscas 3 dias após a eclosão: C1= GMR-Gal4;*w*¹¹¹⁸, aumento de 40x, com seta indicando a medula do lobo óptico da mosca. Imagens ilustrativas da análise histopatológica da medula do lobo óptico da mosca (aumento de 100x): C2= GMR-Gal4;*w*¹¹¹⁸; C3= *w*¹¹¹⁸;UAS-A β . Linhagem GMR-Gal4;UAS-A β tratada com: C4=NT, setas indicam lesões vacuolares; C5= NLC 0,3125%; C6= NLC 0,625%; C7= NLC 1,25%; C8=NLC 2,5%; D1=EM/COP 0,0115; D2=EM/COP 0,023; D3=NLC/COP 0,0115; D4=NLC/COP 0,023; E1=EM/OLI 0,1353; E2=EM/OLI 0,2706; E3=NLC/OLI 0,1353; E4=NLC/OLI 0,2706.). NT: Não Tratado. NLC: Carreador lipídico nanoestruturado controle, sem óleo essencial. EM/COPA: Emulsão de óleo essencial de copaíba. NLC/COPA: Carreador lipídico nanoestruturado com óleo essencial de copaíba. EM/OLI: Emulsão de óleo essencial de olíbano. NLC/OLI: Carreador lipídico nanoestruturado com óleo essencial de olíbano.

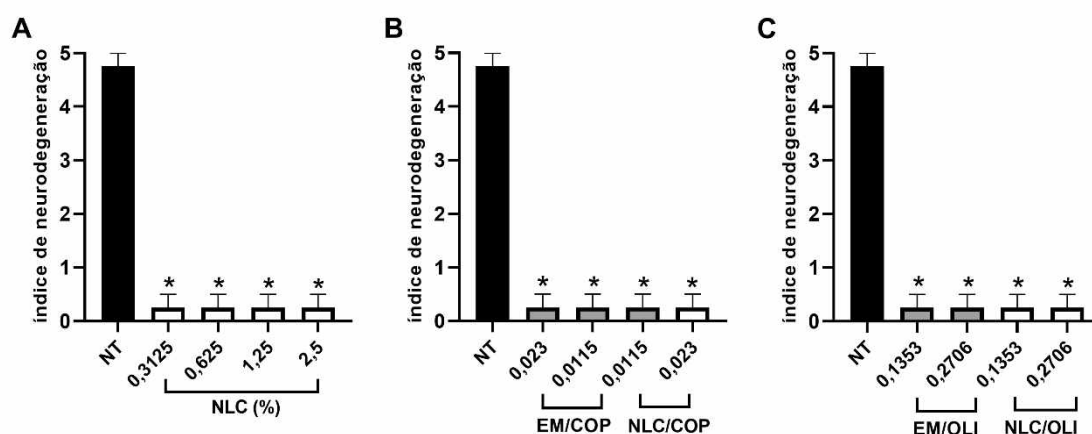


Figura 8. Índice de neurodegeneração do lobo óptico de moscas da linhagem GMR-Gal4;UAS-A β tratadas com as formulações de óleo essencial e formulações controle, com base na análise histopatológica, de acordo com lesões vacuolares. 0 indica ausência de lesões e 5 indica fenótipo neurodegenerativo (n = 3, 3 dias após a eclosão). Os dados são mostrados como a média $\pm$ S.E.M. A significância estatística é indicada como * para $p < 0,05$ vs NT (teste de *Mann Whitney*). NT: Não Tratado. NLC: Carreador lipídico nanoestruturado controle, sem óleo essencial. EM/COPA: Emulsão de óleo essencial de copaíba. NLC/COPA: Carreador lipídico nanoestruturado com óleo essencial de copaíba. EM/OLI: Emulsão de óleo essencial de olíbano. NLC/OLI: Carreador lipídico nanoestruturado com óleo essencial de olíbano.

A Figura 9 mostra secções coradas com vermelho Congo e analisadas sob microscopia de luz/ luz polarizada, indicando a presença/ausência de placas amiloides na retina das moscas adultas. O grupo NT (água) foi o único a apresentar placas amiloides, quando visualizadas sob luz polarizada.

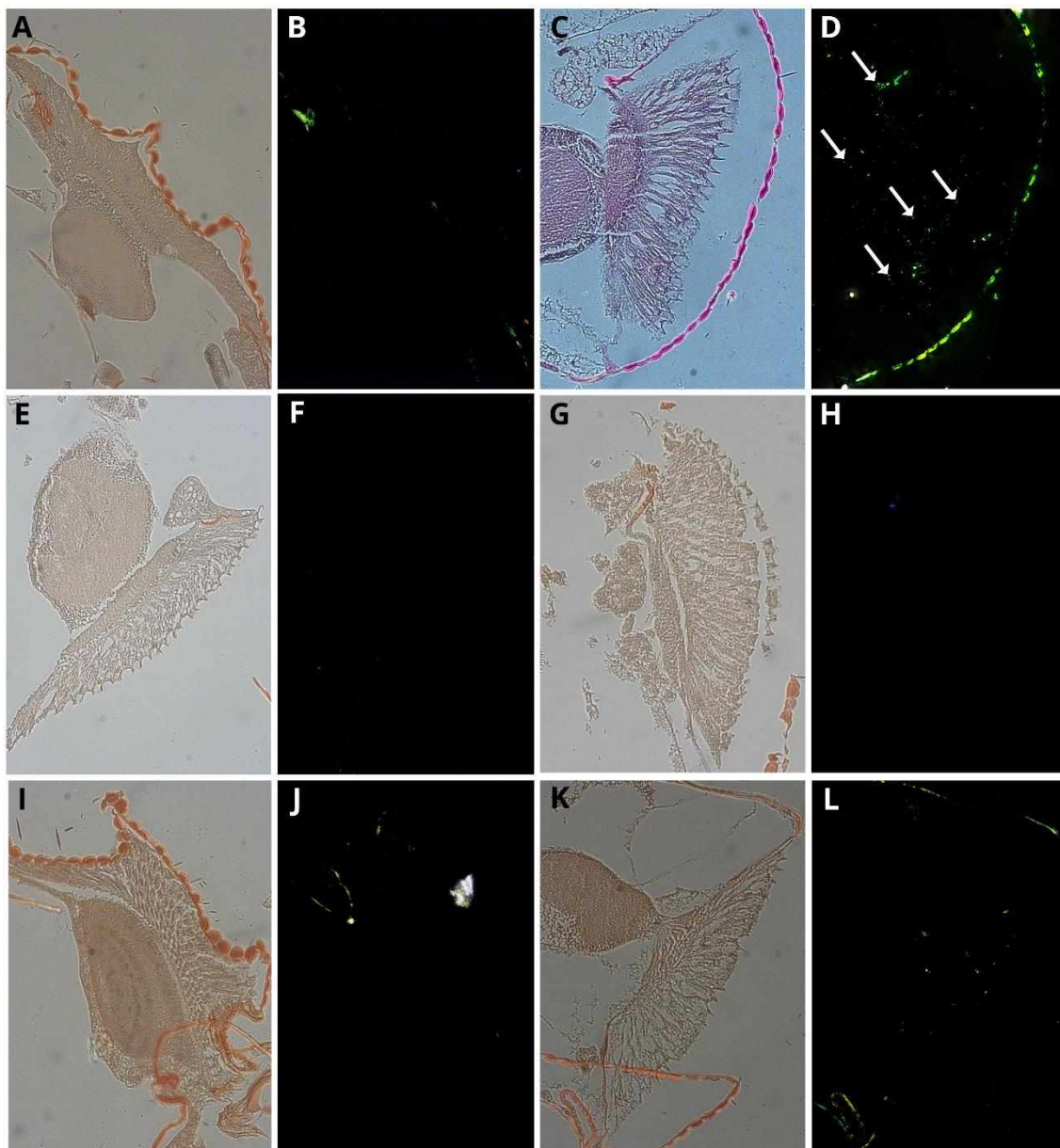


Figura 9. Secções histológicas da retina de drosófilas coradas com vermelho Congo a fim de detectar a presença de placas amiloides. Em A, C, E, G, I e K, analisadas em microscopia de luz e B, D, F, H, J e L sob luz polarizada. Todas as imagens foram capturadas no aumento de 20x. (A, B) GMR-Gal4, (C, D) GMR-Gal4;UAS-A β não-tratada e tratada com: (E, F) NLC 0,3125 %, (G, H) NLC 0,625% (I,J) NLC 1,25% e (K,L) NLC 2,5 %. As setas indicam a presença de

placas amiloides (em verde) na retina da mosca. NT: Não Tratado. NLC: Carreador lipídico nanoestruturado controle, sem óleo essencial.

4 DISCUSSÃO

No processo de desenvolvimento de um novo candidato terapêutico, é de extrema importância avaliar a qualidade, segurança e eficácia da formulação em teste (ANVISA RDC 318, 2019; MUSIELAK, FELICZAK-GUZIŁ & NOWAK, 2022). Tais parâmetros foram avaliados nas formulações de NLC aqui desenvolvidas. A qualidade foi comprovada através de testes de estabilidade físico-química, segurança por intermédio do ensaio de nanotoxicidade e eficácia através da avaliação da atividade antineurodegenerativa no olho das moscas modelo de Alzheimer.

As formulações deste trabalho exibiram tamanhos de partículas compatíveis com NLC após 1 ano, apresentaram distribuição homogênea dos tamanhos conforme o esperado, e foram estáveis por 365 dias em temperatura ambiente (25° C). Cabe ressaltar, que as flutuações de valores aqui observadas e que resultaram em alterações significativas ao longo do tempo, são compatíveis com o comportamento de sistemas coloidais, não estando relacionada a nenhuma tendência de instabilidade físico-química.

A estabilidade em temperatura ambiente é uma característica muito importante, pois não necessitando de refrigeração, a formulação é facilmente armazenada de maneira correta e não acarreta em custos adicionais ao desenvolvimento do produto (COLBERG *et al.* 2017). Além disso, ela é produzida com excipiente naturais de baixo custo e é passível de escalonamento (MUSIELAK, FELICZAK-GUZIŁ & NOWAK, 2022). E almejando uma utilização pela população em geral por meio do Sistema Único de Saúde (SUS), por exemplo, uma opção de um tratamento seguro, eficaz e barato, se torna muito viável (SILVA *et al.* 2024).

Os OE apresentam diversas atividades farmacológicas, mas são limitados por sua natureza hidrofóbica, instabilidade, alta volatilidade e potencial toxicidade (BILIA *et al.*, 2014; CARBONE *et al.*, 2018; CIMINO *et al.*, 2021). O nanoencapsulamento deles é uma boa estratégia para superar essas limitações,

uma vez que possibilita a melhora da estabilidade, toxicidade e biodisponibilidade quando comparado ao composto puro (BILIA *et al.*, 2014; CARBONE *et al.*, 2018; CIMINO *et al.*, 2021). Os OE podem ser empregados simultaneamente como um bioativo e um componente estrutural de NLC, melhorando a biocompatibilidade e diminuindo a toxicidade do óleo puro (GERONIMO *et al.*, 2021; RIBEIRO *et al.*, 2021; CARVALHO *et al.*, 2022). Neste trabalho, os OE demonstraram seu papel estrutural e bioativo nas formulações de NLC, contribuindo para a obtenção de tamanhos de partículas menores e mais homogêneos.

Geronimo e colaboradores (2021) desenvolveram 2 formulações de NLC preparadas com OE de lavanda e melaleuca para entrega de bupivacaína (anestésico local), no tratamento de melanomas. Carvalho e colaboradores (2022), desenvolveram um NLC encapsulando docetaxel (usado no tratamento de câncer de mama) contendo como excipiente funcional o óleo de copaíba, que promoveu significativa redução na viabilidade celular, em especial nas células tumorais. A formulação de NLC produzida por Silva e colaboradores (2020), cuja composição inclui manteiga de abacate, óleo de copaíba e articaína (anestésico local), apresentou atividade anti-inflamatória potencializada.

Os óleos e manteigas vegetais também são utilizados em NLC para potencializar a atividade de compostos ativos, agindo em sinergia com eles (SILVA *et al.*, 2020; GERONIMO *et al.*, 2021; CARVALHO *et al.*, 2022). Neste trabalho, foi observado que as formulações de NLC controle por si só também apresentaram atividade antineurodegenerativa. Isto demonstra de maneira pioneira que a manteiga de karité também apresenta atividade bioativa anti-Alzheimer e provavelmente atua em sinergia com os OE que compõem os NLC.

É conhecido que as manteigas e óleos vegetais são eficazes no tratamento de feridas na pele e apresentam propriedades antimicrobianas, antioxidantes e anti-inflamatórias (POLJŠAK, KREFT & GLAVAČ, 2020). Verma e colaboradores (2012) demonstraram que a manteiga de karité exibiu efeitos anti-inflamatórios. Elsewedy, Shehata & Soliman (2022) produziram uma formulação de SLN, onde a manteiga de karité (lipídio sólido) potencializou a atividade antibacteriana do ácido fusídico (um composto antibacteriano eficiente com solubilidade limitada).

A *Drosophila melanogaster*, com base em ferramentas genéticas bem desenvolvidas, como o sistema de sequência de ativação *upstream* GAL4/UAS

onde é possível regular a expressão de um gene de interesse, tem sido um modelo animal amplamente utilizado no estudo de doenças humanas (GREEVE *et al.*, 2004). Vários trabalhos demonstraram o uso dessas moscas no estudo da DA e sua contribuição para a triagem de moléculas que possam atuar na redução da formação de placas de proteína A β , resultando em diminuição da neurodegeneração (CARMINE-SIMMEN *et al.*, 2009; HARDY & SELOKOE, 2002; DESHPANDE, GOGIA & SINGH, 2019; ALZHEIMER'S ASSOCIATION, 2020). Greeve e colaboradores (2004) demonstraram modelo de *Drosophila* com características neuropatológicas da DA no olho da mosca. Crowther e colaboradores (2005) desenvolveram um modelo de *D. melanogaster* para DA, direcionando a produção de proteína beta amiloide (A β) no sistema nervoso central e na retina das moscas, levando a degeneração dos tecidos. Eles demonstraram que essa degeneração pode ser tratada com intervenção terapêutica eficaz, tornando esse modelo apropriado para o desenvolvimento e testes de agentes terapêuticos. Jonson e colaboradores (2015) geraram uma linhagem transgênica de *Drosophila* UAS, que expressa 11 peptídeos A β . Ela foi gerada por inserção cromossômica idêntica, e cruzadas com uma linhagem condutora Gal/4 (JONSON *et al.*, 2015).

A maioria das concentrações avaliadas não apresentaram toxicidade para a sobrevivência das moscas e as formulações não interferiram na taxa de eclosão e metamorfose delas. Em nosso estudo, a linhagem UAS-A β (Código *Bloomington* BL#64216) expressa os aminoácidos A β humanos 1-42 sob o controle de UAS; e a linhagem GMR-GAL4 (BL#1104), expressa GAL4 no olho das moscas (<https://bdsc.indiana.edu/Home/Search>). Assim, GMR-GAL4 (linhagem *driver*) direciona a expressão da proteína beta amiloide (UAS-A β , linhagem *responder*) para os olhos compostos da mosca e o cruzamento de fêmeas UAS-A β e machos GMR-GAL4 resulta em degeneração do fenótipo ocular devido ao acúmulo de placas A β , desencadeando morte celular neuronal e mimetizando a neuropatologia da DA (DESHPANDE, GOGIA & SINGH, 2019).

Na avaliação da atividade antineurodegenerativa das moscas, as formulações de EM/COPA, EM/OLI, NLC, NLC/COPA e NLC/OLI não apresentaram nanotoxicidade em todas as concentrações testadas e não interferiram na taxa de eclosão e metamorfose das moscas. Além disso, foram

capazes de reduzir a morte neuronal na medula do lobo óptico das moscas, através da redução dos vacúolos de neurodegeneração avaliados nesse tecido, apresentando ação antineurodegenerativa. As diferentes concentrações de NLC testadas também foram capazes de reduzir o acúmulo de A β na retina do olho da mosca, o que foi observado nos cortes histológicos corados com vermelho Congo e visualizados sob luz polarizada.

Embora as emulsões tenham apresentado atividade antineurodegenerativa tais como os NLC, é conhecido que estes últimos são sistemas mais estáveis, que proporcionam uma entrega de ativos e aumentam a biodisponibilidade deles, apresentando baixa nanotoxicidade e boa compatibilidade com substâncias biológicas (MUSIELAK, FELICZAK-GUZYK & NOWAK, 2022). Cabe ressaltar que as emulsões já não são empregadas como sistemas de *delivery*, pois são reconhecidamente instáveis mesmo quando armazenadas em geladeira (ARAÚJO, RIBEIRO & PAULA, 2019). Além disso, as nanopartículas lipídicas (SLN e NLC) são capazes de atravessar barreiras fisiológicas mais complexas, como a barreira hematoencefálica e possibilitam a entrega eficiente de ativos terapêuticos por diversas vias de administração. Somado a isso, a maioria de seus métodos de preparação podem ser facilmente escalonados (MUSIELAK, FELICZAK-GUZYK & NOWAK, 2022).

Pinheiro e colaboradores (2020) desenvolveram nanopartículas lipídicas contendo quercetina, um flavonoide natural com propriedades neuroprotetoras para a DA. Os sistemas foram funcionalizados com transferina para facilitar a travessia da barreira hematoencefálica e foram capazes de reduzir a formação de agregados de proteína A β . Outros estudos também demonstraram sistemas nanocarreadores estáveis com atividade anti-Alzheimer.

NLC carreando curcumina, foi capaz de reduzir as características causadas pelo acúmulo de proteínas A β na DA em modelo animal (MALVAJERD *et al.*, 2019). NLC carreando com berberina apresentou maior potencial no direcionamento para o cérebro e na prevenção e tratamento da DA, obtendo melhores parâmetros comportamentais *in vivo*, do que a berberina pura (RAJU *et al.*, 2021). NLC carreando extrato liofilizado de *Salvia officinalis* (planta com potencial na prevenção e tratamento do Alzheimer), demonstrou maior atividade

antioxidante do que o extrato puro, apresentando potencial direcionamento cerebral e liberação controlada (MARKOVA *et al.*, 2022).

5 CONCLUSÕES

As formulações de NLC encapsulando OE de olíbano e copaíba foram estáveis por 365 dias armazenadas em temperatura ambiente (25° C), o que viabiliza sua produção em larga escala, armazenamento, transporte e distribuição. Além disso, foi demonstrado o duplo papel dos OE nas formulações – bioativo e estrutural - reduzindo os tamanhos de partículas e tornando as formulações mais homogêneas. Foi também observado de maneira pioneira a atividade bioativa da manteiga karité nanoencapsulada e em provável sinergia com OE nos NLC.

As formulações aqui desenvolvidas apresentaram atividade antineurodegenerativa, reduzindo o acúmulo da proteína A β e a morte neuronal das moscas. Este trabalho foi pioneiro em desenvolver NLC carreando OE de copaíba e olíbano para o tratamento do Alzheimer. Os sistemas são promissores para o tratamento em questão e testes em modelos biológicos mais complexos precisam ser realizados para assegurar ainda mais a segurança e eficácia destes sistemas, para permitir posterior ensaio clínico e contribuir fundamentalmente para o avanço do tratamento contra DA.

REFERÊNCIAS

ALZHEIMER'S ASSOCIATION. 2020 Alzheimer's Disease Facts and Figures. **Alzheimer's & Dementia: the journal of the Alzheimer's Association**, v. 16, n. 3, p. 391–460, 2020. <https://doi.org/10.1002/alz.12068>.

ALZHEIMER'S ASSOCIATION. 2023 Alzheimer's disease facts and figures. **Alzheimer's & Dementia**, v. 19, n. 4, fev. 2023. <https://doi.org/10.1002/alz.13016>.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC Nº 318**, de 6 de novembro de 2019. Estabelece os critérios para a realização de Estudos de Estabilidade de insumos farmacêuticos ativos e medicamentos, exceto biológicos, e dá outras providências. Brasília: Diário Oficial da União, 2019. Disponível em: <https://antigo.anvisa.gov.br/documents/10181/3898778/RDC_318_2019_.pdf/72014894-122d-433e-97b0-2c48bfb4ab54>

ARAUJO, D. R.; RIBEIRO, L. N.; PAULA, E. Lipid-based carriers for the delivery of local anesthetics. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 16, n. 7, p. 701–714, 2019. <https://doi.org/10.1080/17425247.2019.1629415>.

BATISTA, L. L. *et al.* Kefir metabolites in a fly model for Alzheimer's disease. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 11262, 27 maio 2021. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-90749-8>

BILIA, A. R. *et al.* Essential Oils Loaded in Nanosystems: A Developing Strategy for a Successful Therapeutic Approach. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2014, p. 1–14, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/651593>

BRASIL, Ministério da Saúde. **Farmacopeia brasileira**. 6 1 v. Brasília: ANVISA, 2019, 904 p. Disponível em: <<https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/farmacopeia/farmacopeia-brasileira>>

BUI, T. T.; NGUYEN, T. H. Natural product for the treatment of Alzheimer's disease. **Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology**, v. 28, n. 5, jan. 2017. <https://doi.org/10.1515/jbcpp-2016-0147>.

CARBONE, C. *et al.* Mediterranean essential oils as precious matrix components and active ingredients of lipid nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 548, n. 1, p. 217–226, set. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2018.06.064>.

CARMINE-SIMMEN, K. *et al.* Neurotoxic effects induced by the Drosophila amyloid- β peptide suggest a conserved toxic function. **Neurobiology of Disease**, v. 33, n. 2, p. 274–281, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2008.10.014>.

CARVALHO, F. V. *et al.* Docetaxel Loaded in Copaiba Oil-Nanostructured Lipid Carriers as a Promising DDS for Breast Cancer Treatment. **Molecules**, v. 27, n. 24, p. 8838–8838, 2022. <https://doi.org/10.3390/molecules27248838>.

CIMINO, C. et al. Essential Oils: Pharmaceutical Applications and Encapsulation Strategies into Lipid-Based Delivery Systems. **Pharmaceutics**, v. 13, n. 3, p. 327, 3 mar. 2021. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13030327>.

COLBERG, L. et al. Incorrect storage of medicines and potential for cost savings. **European Journal of Hospital Pharmacy**, v. 24, n. 3, p. 167–169, 2017. <https://doi.org/10.1136/ejhpharm-2015-000744>

CUMMINGS, J. L.; MORSTORF, T.; ZHONG, K. Alzheimer's disease drug-development pipeline: few candidates, frequent failures. **Alzheimer's Research & Therapy**, v. 6, n. 4, p. 37, 2014. <https://doi.org/10.1186/alzrt269>.

DESHPANDE, P.; GOGIA, N.; SINGH, A. Exploring the efficacy of natural products in alleviating Alzheimer's disease. **Neural Regeneration Research**, v. 14, n. 8, p. 1321–1329, 2019. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.253509>.

ELSEWEDY, H. S.; SHEHATA, T. M.; SOLIMAN, W. E. Shea Butter Potentiates the Anti-Bacterial Activity of Fusidic Acid Incorporated into Solid Lipid Nanoparticle. **Polymers**, v. 14, n. 12, p. 2436, 2022. <https://doi.org/10.3390/polym14122436>.

FIRDAUS, Z.; SINGH, T. D. An Insight in Pathophysiological Mechanism of Alzheimer's Disease and its Management Using Plant Natural Products. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 21, n. 1, p. 35–57, jan. 2021. <https://doi.org/10.2174/1389557520666200730155928>.

GERONIMO, G. et al. Development of S 75 : R 25 bupivacaine-loaded lipid nanoparticles functionalized with essential oils for treating melanoma. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 96, n. 8, p. 2197–2207, 2021. <https://doi.org/10.1002/jctb.6715>.

GREEVE, I. Age-Dependent Neurodegeneration and Alzheimer-Amyloid Plaque Formation in Transgenic Drosophila. **Journal of Neuroscience**, v. 24, n. 16, p. 3899–3906, 2004. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0283-04.2004>.

HARDY, J.; SELKOE, D. J. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. **Science (New York, N.Y.)**, v. 297, n. 5580, p. 353–6, 2002. <https://doi.org/10.1126/science.1072994>.

JONSON, M. et al. Systematic A β Analysis in Drosophila Reveals High Toxicity for the 1-42, 3-42 and 11-42 Peptides, and Emphasizes N- and C-Terminal Residues. **PLOS ONE**, v. 10, n. 7, p. e0133272–e0133272, jul. 2015. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0133272>.

KHAN, T. et al. Recent Advancement in Therapeutic Strategies for Alzheimer's Disease: Insights from Clinical Trials. **Ageing Research Reviews**, n. 92, p. 102113, 31 out. 2023. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2023.102113>.

KIM, C. K. et al. Alzheimer's Disease: Key Insights from Two Decades of Clinical Trial Failures. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 87, n. 1, p. 1–18, mar. 2022.

<https://doi.org/10.3233/JAD-215699>.

KOHOUE, M. J. *et al.* Chemical composition and biological activities of extracts and essential oil of *Boswellia dalzielii* leaves. **Pharmaceutical Biology**, v. 55, n. 1, p. 33–42, 1 jan. 2017. <https://doi.org/10.1080/13880209.2016.1226356>

LENZ, S. *et al.* Drosophila as a screening tool to study human neurodegenerative diseases. **Journal of Neurochemistry**, v. 127, n. 4, p. 453–460, out. 2013. <https://doi.org/10.1111/jnc.12446>.

LIMA, L. R. *et al.* Anti-acetylcholinesterase and toxicity against *Artemia salina* of chitosan microparticles loaded with essential oils of *Cymbopogon flexuosus*, *Pelargonium x ssp* and *Copaifera officinalis*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 167, p. 1361–1370, jan. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.11.090>

MALTA, S. M. *et al.* Identification of bioactive peptides from a Brazilian kefir sample, and their anti-Alzheimer potential in *Drosophila melanogaster*. **Scientific Reports**, v. 12, n. 1, p. 11065, 30 jun. 2022. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-15297-1>

MALVAJERD, S. S. *et al.* Neuroprotective Potential of Curcumin-Loaded Nanostructured Lipid Carrier in an Animal Model of Alzheimer's Disease: Behavioral and Biochemical Evidence. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 69, n. 3, p. 671–686, 4 jun. 2019. <https://doi.org/10.3233/JAD-1900834>.

MARKOVA, E. *et al.* Design and evaluation of nanostructured lipid carriers loaded with *Salvia officinalis* extract for Alzheimer's disease treatment. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**, 12 jan. 2022. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.35006>.

MCGURK, L.; BERSON, A.; BONINI, N. M. *Drosophila* as an In Vivo Model for Human Neurodegenerative Disease. **Genetics**, v. 201, n. 2, p. 377–402, out. 2015. <https://doi.org/10.1534/genetics.115.179457>.

MUSIELAK, E.; FELICZAK-GUZIK, A.; NOWAK, I. Synthesis and Potential Applications of Lipid Nanoparticles in Medicine. **Materials**, v. 15, n. 2, p. 682, jan. 2022. <https://doi.org/10.3390/ma15020682>.

NOORI, T. *et al.* Role of natural products for the treatment of Alzheimer's disease. **European Journal of Pharmacology**, v. 898, p. 173974, maio 2021. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2021.173974>.

PDQ INTEGRATIVE, ALTERNATIVE, AND COMPLEMENTARY THERAPIES EDITORIAL BOARD. **Aromatherapy With Essential Oils (PDQ®): Health Professional Version**. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26389313/>.

PINHEIRO, R. G. R. *et al.* Quercetin lipid nanoparticles functionalized with transferrin for Alzheimer's disease. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 148, p. 105314, maio 2020. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2020.105314>.

POLJŠAK, N.; KOČEVAR GLAVAČ, N. Vegetable Butters and Oils as Therapeutically and Cosmetically Active Ingredients for Dermal Use: A Review of Clinical Studies. **Frontiers in Pharmacology**, v. 13, p. 868461, 2022. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.868461>.

RAJU, M. *et al.* Berberine loaded nanostructured lipid carrier for Alzheimer's disease: Design, statistical optimization and enhanced in vivo performance. **Life Sciences**, v. 285, p. 119990, nov. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2021.119990>.

RIBEIRO, L. N. M. *et al.* Natural lipids-based NLC containing lidocaine: from pre-formulation to in vivo studies. **European Journal of Pharmaceutical Sciences: Official Journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences**, v. 106, p. 102–112, 30 ago. 2017. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2017.05.060>

RIBEIRO, L. N. M. *et al.* Nanocarriers From Natural Lipids With In Vitro Activity Against *Campylobacter jejuni*. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 10, p. 571040, 8 jan. 2021. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.571040>

RODRIGUES, T. S. Análise do secretoma de bactérias isoladas do alimento de larvas de abelhas brasileiras sem ferrão em *Drosophila melanogaster* modelo para Doença de Alzheimer. **Repositorio.ufu.br**, 2021.

SANTOS, N. C. L. *et al.* Antioxidant and anti-Alzheimer's potential of *Tetragonisca angustula* (Jataí) stingless bee pollen. **Scientific Reports**, v. 14, n. 1, p. 308, 3 jan. 2024. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-51091-3>

SILVA, G. H. R. *et al.* Articaine in functional NLC show improved anesthesia and anti-inflammatory activity in zebrafish. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, 12 nov. 2020. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-76751-6>

SILVA, E. F. *et al.* Lipid nanoparticles based on natural matrices with activity against multidrug resistant bacterial species. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 13, p. 1328519, 2024. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2023.1328519>

SOUSA, D. P. DE *et al.* Essential Oils: Chemistry and Pharmacological Activities. **Biomolecules**, v. 13, n. 7, p. 1144, jul. 2023. <https://doi.org/10.3390/biom13071144>.

VAZ, M.; SILVESTRE, S. Alzheimer's disease: Recent treatment strategies. **European Journal of Pharmacology**, v. 887, n. 1, p. 173554, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2020.173554>.

VERMA, N. *et al.* Anti-Inflammatory Effects of Shea Butter through Inhibition of Inos, Cox-2, and Cytokines via the Nf-Kb Pathway in Lps-Activated J774 Macrophage Cells. **Journal of Complementary and Integrative Medicine**, v. 9, n. 1, p. 1–11, 2012. <https://doi.org/10.1515/1553-3840.1574>.