



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE RORAIMA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE
E BIOTECNOLOGIA - REDE BIONORTE**



**PRODUÇÃO E AVALIAÇÃO DE NANOEMULSÕES CONTENDO
ÓLEO ESSENCIAL DE *Bauhinia unguolata* COMO ALTERNATIVA NO
TRATAMENTO DA DOENÇA DE ALZHEIMER**

SANDRA REGINA NUNES DE ANDRADE MEDEIROS

**Boa Vista - RR
JULHO/2024**

SANDRA REGINA NUNES DE ANDRADE MEDEIROS

**PRODUÇÃO E AVALIAÇÃO DE NANOEMULSÕES CONTENDO
ÓLEO ESSENCIAL DE *Bauhinia unguolata* COMO ALTERNATIVA NO
TRATAMENTO DA DOENÇA DO ALZHEIMER**

Tese apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia – Rede BIONORTE, na Universidade Federal de Roraima, como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Biotecnologia.

Orientador: Dr. Antonio Alves de Melo Filho

Coorientadora: Dr^a. Priscila Gubert

Boa Vista - RR

JULHO/2024

Dados Internacionais de Catalogação na publicação (CIP)
Biblioteca Central da Universidade Federal de Roraima

M488p Medeiros, Sandra Regina Nunes de Andrade.

Produção e avaliação de nanoemulsões contendo óleo essencial de *Bauhinia unguulara* / Sandra Regina Nunes de Andrade Medeiros. – Boa Vista, 2024.

126 f. : il. Inclui Anexos.

Orientador: Dr. Antonio Alves de Melo Filho. Coorientadora: Dra. Priscila Gubert.

Tese (Doutorado em Biodiversidade e Biotecnologia) - Universidade Federal de Roraima. Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia - Rede Bionorte.

1. α -Bisabolol. 2. Alzheimer. 3. *Bauhinia*. 4. Antioxidante. I. Título.
II. Melo Filho, Antonio Alves de (orientador). III. Gubert, Priscila (coorientadora).

CDU (2. ed.) 581.6

Ficha Catalográfica elaborada pela Bibliotecária/Documentalista (UFRR):

Maria de Fátima Andrade Costa - CRB-11/453-AM

SANDRA REGINA NUNES DE ANDRADE MEDEIROS


**PRODUÇÃO E AVALIAÇÃO DE NANOEMULSÕES CONTENDO ÓLEO
ESSENCIAL DE *Bauhinia unguolata* COMO ALTERNATIVA NO
TRATAMENTO DO ALZHEIMER**

Tese apresentada como Pré- requisito
para defesa do Curso de Doutorado em
Biotecnologia da Rede BIONORTE, Polo
Roraima defendida 11 de Julho de 2024 e
avaliada pela seguinte banca examinadora:

Aprovada em:
11/07/2024


Banca examinadora

Documento assinado digitalmente

 **ANTONIO ALVES DE MELO FILHO**
Data: 17/02/2025 12:50:59-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>


Prof.. Dr. Antonio Alves de Melo Filho
(Orientador) Universidade Federal de Roraima

Documento assinado digitalmente

 **EDVAN ALVES CHAGAS**
Data: 17/02/2025 15:57:08-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>


Pesq. Dr. Edvan Alves Chagas - EMBRAPA

Documento assinado digitalmente

 **ELIAS ARIEL DE MOURA**
Data: 18/02/2025 15:14:04-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>


Prof. Dr. Elias Ariel de Moura - PNDP - UFRR

Documento assinado digitalmente

 **MOISES FELIX DE CARVALHO NETO**
Data: 18/02/2025 15:34:59-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Moisés Félix de Carvalho Neto - UFAM

Documento assinado digitalmente

 **RICARDO CARVALHO DOS SANTOS**
Data: 18/02/2025 16:31:24-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Ricardo Carvalho dos Santos - UFRR

TERMO DE AUTORIZAÇÃO DE PUBLICAÇÃO

Eu, Sandra Regina Nunes de Andrade Medeiros, (X) autorizo () não autorizo, a publicação da versão final aprovada de minha Tese de Doutorado intitulada “Produção e avaliação de nanoemulsões contendo óleo essencial de *Bauhinia unguolata* como alternativa no tratamento da doença de Alzheimer” no Portal do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia - Rede BIONORTE (PPG-BIONORTE), bem como no repositório de Teses da CAPES ou junto à biblioteca da Instituição Certificadora.

Boa Vista, 11 de Julho de 2024



Documento assinado digitalmente

SANDRA REGINA NUNES DE ANDRADE MEDEIRO

Data: 15/02/2025 18:10:59-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Sandra Regina Nunes de Andrade Medeiros

CPF: 022.110.024-55

RG: 1593279 (SSP/RN)

À minha mãe, meu pai, meus irmãos, meu esposo, meu filho, pelo amor, carinho, orientação e confiança que sempre depositaram em mim. A todos meus familiares, pela ajuda, dedicação e compreensão.

AGRADECIMENTOS

A Deus, minha fortaleza e meu fiel protetor que tornou possível todas as coisas.

Aos meus familiares, tios, primos, cunhados e cunhadas minha sogra Dalva e meu sogro Aluísio in memória e em especial minha mãe Lionete, meu pai, Marcos, meu esposo Paulo, meu filho Paulo filho, meu neto Paulo Ravi, meus irmãos Maria de Lourdes, Gislayne, Vanessa, Andressa, Mozart e Abílio, Marcel, minha avó Laurita, meus avós Maria de Lourdes, Vicente e Abílio in memoria meus sobrinhos Eric, Debora, Fernanda, Marcos Neto, Gustavo, Vinicius, Heloisa, Matheus, Pedro, Letícia, João Miguel, Caio, Mozart Jr, Amanda, João Miguel, a os meus tios, tias, primos, cunhados, que são a minha base familiar e me tornam a pessoa que sou e não mediram esforços em mais essa etapa da minha vida.

Ao meu orientador Prof^o. Dr. Antonio Alves pela orientação, dedicação, paciência e incentivo que fez com que eu nunca esmorecesse mesmo nas dificuldades.

A minha coorientadora Dr^a. Priscila Gubert, pelo profissionalismo, dedicação, paciência, incentivo, por ter me aceitado como orientanda e aberto as portas de seu laboratório colocando seus alunos de iniciação científica e orientandos a disposição para que os experimentos *in vivo* com *C. elegans*, fossem realizados.

Ao Professor Dr. Jorge Neves e seus alunos Thais, Franciane, do laboratório de Química da UFPE pela parceria e colaboração com os experimentos químicos.

Aos colegas de doutorado Conrado, Isabel, Artur, que fizeram parte integrante nos estudos, nos dias e finais de semana de serão no laboratório, nas dificuldades enfrentadas, como também nos momentos de risos e gargalhadas.

A técnica e amiga de laboratório Cristina pela amizade, apoio, incentivo e colaboração. Ao Laboratório de Cromatografia do Departamento de Química da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), em especial a Dra. Vany Ferraz, pelas análises químicas para identificação dos compostos voláteis.

Ao Laboratório de Neuroimunogenética (UFPE) iLIKA por ter permitido a realização dos experimentos *in vivo*.

Em especial ao amigo que fiz na UFPE, Caio (*in memorian*) pela amizade, ajuda e colaboração nos experimentos meu muito obrigada.

Aos alunos de IC do laboratório de Neuroimunogenética da UFPE Amanda, Laura, Luana, doutorando Daniel pela colaboração.

A Lucas pela colaboração para realização da ancoragem molecular.

A Flávia, pelo coleguismo e colaboração nos experimentos com o leitor de elisa.

Ao amigo Regildo Gomes Martins, pela parceria, amizade e imensa colaboração, para que eu realizasse os experimentos.

Ana Maria Moniz, Conceição e Pedro pela amizade e colaboração.

Ao amigo Iverson Conrado Bezerra, pela amizade, paciência, colaboração nos estudos, ajuda na elaboração dos protocolos e pela real parceria nos experimentos.

A minha amiga Isabel pela amizade, parceria e colaboração.

A Professora Dr^a Riva de Paula por ter cedido as cepas de Alzheimer do *C. elegans* CL 2006.

Ao grupo Oleoquímicos, Alessandro, Leticia, Pedro e os demais que fizeram parte desse trabalho.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”.

(Marthin Luther King).

MEDEIROS, Sandra Regina Nunes de Andrade. Produção e avaliação de nanoemulsões contendo óleo essencial de *Bauhinia unguolata* como alternativa no tratamento da doença de Alzheimer. 2024. 126 f. Tese de Doutorado em Biodiversidade e Biotecnologia – Rede Bionorte – Universidade Federal de Roraima, Boa Vista, 2024.

RESUMO

A espécie *Bauhinia unguolata* pertence à família Fabaceae, popularmente conhecida como pata-de-vaca, encontra-se entre as espécies de uso medicinal no Brasil, utilizada principalmente no tratamento da diabetes. Neste trabalho, o objetivo foi estudar a interação dos constituintes químicos presentes no óleo essencial de *B. unguolata* (OEBU), coletada no Município de Boa Vista, Roraima, Amazônia Legal, e seus os efeitos sob a enzima acetilcolinesterase (AChE), com ênfase no tratamento do Alzheimer. Avaliou-se também os aspectos qualitativo e quantitativo por cromatografia gasosa (CG-EM e CG-DIC) dos constituintes químicos do OEBU, bem como análises de RMN de ^1H , ancoragem molecular, predição de toxicidade *in silico*, análise de enriquecimento e predição de alvos de interação biológica, determinação da atividade antioxidante, como atividade antioxidante total (CAT), sequestro de radical livre (DPPH), poder redutor e quelação de Fe^{2+} . Nas atividades biológicas *in vivo* utilizou-se a cepa selvagem N2 do organismo modelo *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*), os quais foram submetidos a testes de sobrevivência, batimento faríngeo e inibição da enzima AChE. A análise cromatográfica revelou 25 componentes, dos quais os majoritários foram o α -bisabolol (27,2%) β -cariofileno (12,5%), epi- γ -eudesmol (13,6%), α -humuleno (4,5%) óxido de cariofileno (4,3%), γ -muuroleno (3,4%). Nos testes *in vitro* para avaliação inibitória da enzima AChE o óleo essencial obteve inibição de 100%. O componente volátil majoritário α -Bisabolol apresentou maior deslocamento químico no espectro de RMN ^1H . Nos testes da atividade antioxidante, o OEBU apresentou valor de CAT na concentração de $0,1\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ aproximadamente de 618,79 mg de ácido ascórbico equivalente, nas concentrações de $0,25\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ e $5\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ apresentou capacidade de sequestro de radicais livres em torno de 43% e 65% respectivamente. O OEBU apresentou capacidade quelante Fe^{2+} nas concentrações testadas possui em torno de 96% de fenóis totais e um poder redutor em torno de 77% na concentração de $0,5\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$. Não apresentou diferença significativa em relação ao grupo controle na toxicidade ao *C. elegans* nas concentrações testadas ($0,0125 - 0,75\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$). No ensaio na avaliação do OEBU em relação ao batimento faríngeo do *C. elegans*, houve uma redução na taxa de alimentação do verme podendo indicar a inibição da AChE a qual foi constatada no ensaio de inibição de AChE usando o nematódeo de até 74,45% na concentração de $0,025\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$. Os resultados deste trabalho mostraram que OEBU agiu como um inibidor da enzima AChE tanto nos ensaios *in vitro* como *in vivo* bem como apresentou atividade oxidante. As formulações obtidas do

OEBU apresentaram diferenças significativas em relação aos surfactantes DMSO e TW80, podendo ser utilizado no tratamento da doença do Alzheimer na forma de nanoemulsão.

Palavras-Chave: α -Bisabolol; Alzheimer; *Bauhinia*; Antioxidante.

MEDEIROS, Sandra Regina Nunes de Andrade. Production and evaluation of nanoemulsions containing *Bauhinia unguolata* essential oil as an alternative in the treatment of Alzheimer's disease. 2024. 126 f. Tese de Doutorado em Biodiversidade e Biotecnologia – Rede Bionorte – Universidade Federal de Roraima, Boa Vista, 2024.

ABSTRACT

The species *Bauhinia unguolata* belongs to the Fabaceae family, popularly known as pata-de-vaca, and is among the species used medicinally in Brazil, mainly in the treatment of diabetes. In this work, the objective was to study the interaction of the chemical constituents present in the essential oil of *B. unguolata* (OEBU), collected in the municipality of Boa Vista, Roraima, Legal Amazon, and their effects on the enzyme acetylcholinesterase (AChE), with emphasis on the treatment of Alzheimer's. The qualitative and quantitative aspects by gas chromatography (GC-MS and GC-DIC) of the chemical constituents of OEBU were also evaluated, as well as ¹H NMR analyses, molecular docking, in silico toxicity prediction, enrichment analysis and prediction of biological interaction targets, determination of antioxidant activity, such as total antioxidant activity (CAT), free radical scavenging (DPPH), reducing power and Fe²⁺ chelation. In vivo biological activities were performed using the wild strain N2 of the model organism *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*), which were subjected to survival, pharyngeal beating and AChE enzyme inhibition tests. Chromatographic analysis revealed 25 components, the major ones being α -bisabolol (27.2%), β -caryophyllene (12.5%), epi- γ -eudesmol (13.6%), α -humulene (4.5%), caryophyllene oxide (4.3%), and γ -muurolene (3.4%). In in vitro tests to evaluate the inhibitory effect of the AChE enzyme, the essential oil showed 100% inhibition. The major volatile component α -Bisabolol showed the highest chemical shift in the ¹H NMR spectrum. In the antioxidant activity tests, OEBU presented a CAT value at a concentration of 0.1 mg.mL⁻¹ of approximately 618.79 mg of ascorbic acid equivalent, at concentrations of 0.25 mg.mL⁻¹ and 5 mg.mL⁻¹ it presented a free radical scavenging capacity of around 43% and 65% respectively. OEBU presented a Fe²⁺ chelating capacity at the concentrations tested, has around 96% of total phenols and a reducing power of around 77% at a concentration of 0.5 mg.mL⁻¹. It did not present a significant difference in relation to the control group in toxicity to *C. elegans* at the concentrations tested (0.0125 - 0.75 mg.mL⁻¹). In the assay evaluating OEBU in relation to the pharyngeal beating of *C. elegans*, there was a reduction in the worm's feeding rate, which may indicate the inhibition of AChE, which was observed in the AChE inhibition assay using the nematode of up to 74.45% at a concentration of 0.025 mg.mL⁻¹. The results of this work showed that OEBU acted as an inhibitor of the AChE enzyme in both in vitro and in vivo assays, as well as presenting oxidative activity. The formulations obtained from OEBU presented significant differences in relation to the surfactants DMSO and TW80,

and can be used in the treatment of Alzheimer's disease in the form of non-emulsion.

Keywords: α Bisabolol, Alzheimer, *Bauhinia*, essential oil.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Espécie <i>Bauhinia unguolata</i> em seu habitat natural.	21
Figura 2 - Distribuição geográfica da espécie <i>Bauhinia unguolata</i> no Brasil	22
Figura 3 - Arbusto e partes da planta <i>Bauhinia unguolata</i> .	23
Figura 4 - Desenho e imagem das regiões do cérebro normal e com Alzheimer	25
Figura 5 - Neurônios normais e com agregação dos peptídeos A β .	26
Figura 6 - Esquema da enzima AChE.	27
Figura 7 - Estrutura geral de nanocarreadores utilizados para direcionar os agentes farmacológicos ou princípio ativo até o cérebro.	29
Figura 8 - Faixa de escala nanométrica	30

CAPÍTULO 1

Figura 1 - Principais constituintes do OEUBU.	44
Figura 2 - Poder redutor do óleo essencial <i>B.ungulata</i> OEUBU.	45
Figura 3 - Quelação de ferro do óleo essencial <i>B.ungulata</i> OEUBU.	46
Figura 4 - Capacidade de Radicais livres DPPH do OEUBU.	47
Figura 5 - Interações Fitoquímicas e controle com enzima catalase humana (CATH).	50

CAPÍTULO 2

Figura 1 - Gráfico de Inibição da enzima AChE in vitro do OEUBU.	63
Figura 2 - Estruturas do OEUBU e interação dos resíduos de ligação com a AChE humana.	66
Figura 3 - Estruturas do OEUBU e interação dos resíduos de ligação com a AChE <i>E. electrus</i> .	67
Figura 4 - Grafico de dispersão 3D.	71
Figura 5 - Análise de enriquecimento da via ShiGo KEEGG dos alvos previstos, com valor de corte P (FDR) de 0,05.	73
Figura 6 - Espectro de RMN ¹ H do OEUBU.	75
Figura S1 - Análise da validação do Verify 3D 90,54 % <i>Electrophorus Electrus</i>	82

CAPÍTULO 3

Figura 1- Ciclo de vida do nematódeo <i>C. elegans</i> á 20 °C	88
Figura 2- Principais características da anatomia do nematoide <i>C. elegans</i>	89
Figura 3- Etapas do Experimento da AChE in vivo.	96
Figura 4- Caracterização de nanoemulsões em DMSO do OEBU em diferentes tempos de sonicação (4 e 10 minutos).	100
Figura 5- Caracterização de nanoemulsões em tween 80 de OEBU em diferentes tempos de sonicação (5 e 10 minutos) e concentrações.	101
Figura 6- Estabilidade das nanoformulações compostas por Tween 80 a 0,5% após centrifugação.	103
Figura 7- Estabilidade das nanoformulações compostas por Tween 80 a 1%	103
Figura 8- Estabilidade das nanoformulações compostas por Tween 80 1% após centrifugação	104
Figura 9- Estabilidade das nanoformulações compostas por 0.5% DMSO após centrifugação	104
Figura 10- Fotografia de microscopia óptica das placas contendo nanoformulações de OEBU	105
Figura 11- Fotografia óptica das placas contendo emulsão	106
Figura 12- Sobrevivência de <i>C. elegans</i> após a exposição à emulsão e nanoemulsão.	107
Figura 13- Ciclos de defecação do <i>C. elegans</i>	108
Figura 14- Comportamento alimentar do <i>C. elegans</i>	109
Figura 15- O comprimento corporal e o desenvolvimento de <i>C. elegans</i>	111
Figura 16- Os impactos na reprodução de <i>C. elegans</i> em OEBU	112
Figura 17- Inibição da AChE pela emulsão do OEBU	114
Figura 18- Estrutura da AChE de <i>C. elegans</i>	115
Figura 19- Verificação dos resultados da Validação 3D	115
Figura 20- Resultados da energia de ligação de AChE de <i>C. elegans</i> e OEBU	116
Figura 21- Perfil de interação com rivastigmina α bisabolol e óxido de α bisabolol	117

LISTA DE TABELAS**CAPÍTULO 1**

Tabela 1- Os fitoquímicos de OEBU obtido por CG- MS	43
Tabela 2- Mapeamento de interações fitoquímicas e controle com proteína catalase humana (CATH).	51

CAPÍTULO 2

Tabela 1- Menor energia de ligação em Kcal.mol ⁻¹ de cada ligante á acetilcolinesterase de humana	64
Tabela 2- Menor energia de ligação em Kcal.mol ⁻¹ de cada ligante á acetilcolinesterase de <i>E. electricus</i>	65
Tabela 3- Resultados ADME Suíços.	70
Tabela4- Alterações químicas de prótons causadas após interações de α - Bisabolol com acetilcolinesterase.	76
Tabela S1- AChE Humana resultados de reenquadramento.	83
Tabela S2- <i>E. electricus</i> resultados de reenquadramento	85

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

Aβ	Peptídeo beta-amilóide
ACh	Acetilcolina
AChE	Acetilcolinesterase
AChEh	Acetilcolinesterase humana
ATCI	Cloreto de Acetilcolina
ADME	Absorção, Distribuição e Excreção
BHI	Brain Heart Infusion (Infusão de cérebro e coração)
BHE	Barreira hematoencefálica
BU	<i>Bauhinia unguolata</i>
CAT	Capacidade antioxidante Total
CATh	Catalase humana
<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
CG-DIC	Cromatografia Gasosa com Detector por Ionização de
Chama CG-EM	Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de
massas CL₅₀	Concentração Letal 50%
DA	Doença de Alzheimer
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNs	Doenças neurodegenerativas
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazil
DTNB	5',5'-ditiobis-(2-ácido nitrobenzóico)
EROs	Espécies reativas de oxigênio
ERNs	Espécies reativas de nitrogênio
Fe²⁺	Ferro
FDA	Food and Drug Administration
INPA	Instituto Nacional de Pesquisas Amazônica
K.I	índice de Kovats
mL	Mililitro
μL	Microlitros
nm	Nanômetro
NBU	Nanoemulsão de <i>Bauhinia unguolata</i>
OEBU	Óleo essencial de <i>Bauhinia unguolata</i>

OMS	Organização Mundial de Saúde
%	Porcentagem
RMN ¹H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
S	Desvio Padrão
SOD	Superóxido dismutase
SNC	Sistema Nervoso Central
Tris HCl	Ultrapure hydrochloride
U/mL	Unidades por mL
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
UFRR	Universidade Federal de Roraima
UFRN	Universidade Federal do Rio Grande do Norte

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	17
1.1 OBJETIVO GERAL.....	20
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	20
1.3 JUSTIFICATIVA.....	20
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	21
2.1 GÊNERO <i>Bauhinia</i>	21
2.1.1 Espécie <i>Bauhinia unguolata</i>.....	21
2.2 DOENÇA DE ALZHEIMER.....	23
2.2.1 A hipótese da cascata amilóide.....	25
2.2.2 Hipótese colinérgica.....	27
2.3 PLANTAS MEDICINAIS E ALZHEIMER.....	27
2.4 ÓLEOS ESSENCIAIS.....	28
2.5 NANOTECNOLOGIA.....	28
REFERÊNCIAS.....	32
CAPÍTULO 1 - ATIVIDADE ANTIOXIDANTE IN VITRO E IN SILICO E CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>Bauhinia unguolata</i>	
1 INTRODUÇÃO.....	38
2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	39
2.1 OBTENÇÃO DE FOLHAS DE <i>Bauhinia unguolata</i>	38
2.2 EXTRAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL.....	39
2.3 CROMATOGRAFIA.....	39
2.3.1 Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (CG-EM)	40
2.3.2 Cromatografia gasosa com detector de ionização de chama (CG-DIC)	40
2.4 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE IN VITRO DE OEBU.....	40
2.4.1 Teste de capacidade antioxidante total (cat).....	40
2.4.2 Reduzindo o teste de potência.....	40
2.4.3 Teste de capacidade quelante de íons de ferro (Fe²⁺).....	41
2.4.4 Capacidade de eliminação de 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (dpph).....	41
2.4.5 Constituição Fenólica.....	41
2.5 ANÁLISE IN SILICO.....	42
2.5.1 Ancoragem molecular.....	42
2.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	42
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	42
3.1 DESEMPENHO E COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO OEBU.....	42
3.2 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	44
3.3 ANÁLISE IN SILICO.....	49
4 CONCLUSÃO.....	53
REFERÊNCIAS.....	54
CAPÍTULO 2 - AVALIAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>Bauhinia unguolata</i> COMO NOVO INIBIDOR DA ACETILCOLINESTERASE SOB PERSPECTIVA IN SILICO E IN VITRO NO NORTE DA AMAZÔNIA BRASILEIRA	
1 INTRODUÇÃO.....	57

2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	59
2.1 OBTENÇÃO DAS FOLHAS DE <i>Bauhinia unguolata</i>	59
2.2 EXTRAÇÃO DE ÓLEO ESSENCIAL.....	59
2.3 ATIVIDADE ENZIMÁTICA.....	59
2.3.1 Inibição da enzima acetilcolinesterase.....	59
2.4 RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE PRÓTONS (¹ H RMN).....	60
2.5 ANÁLISE COMPUTACIONAL.....	60
2.5.1 Ancoragem molecular in sílico.....	60
2.5.2 Previsão de parâmetros farmacocinéticos.....	61
2.5.3 Previsão de interação medicamento-alvo e análise de enriquecimento....	61
2.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	62
2.7 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	62
2.8 INIBIÇÃO ENZIMÁTICA.....	62
2.9 ANÁLISE COMPUTACIONAL.....	63
2.9.1 Ancoragem molecular.....	63
2.9.2 A análise ADME mostra baixa toxicidade para as moléculas principais de OEBU.....	68
2.9.3 Previsão de alvo e análise de enriquecimento.....	72
3 RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE PRÓTONS (1 H RMN) DE OEBU.	74
4 CONCLUSÃO.....	77
REFERÊNCIAS.....	78
Material Suplementar.....	82
CAPÍTULO 3 - ATIVIDADE BIOLÓGICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>Bauhinia unguolata</i> EM NANOEMULSÃO UTILIZANDO O MODELO IN VIVO <i>Caenorhabditis elegans</i>	
1INTRODUÇÃO.....	87
1.2 <i>Caenorhabditis elegans</i> COMO FERRAMENTA DE ESTUDO NA DOENÇA DE ALZHEIMER.....	88
2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	90
2.1 REAGENTES QUÍMICOS.....	90
2.2 ÓLEO ESSENCIAL DE <i>Bauhinia unguolata</i>	90
2.3 PREPARAÇÃO DAS FORMULAÇÕES CONTENDO O ÓLEO ESSENCIAL DE <i>B. unguolata</i>	90
2.3.1 Tamanho de partícula, potencial Zeta e índice de polidispersidade da nanoemulsão.....	90
2.3.2 Ciclo de resfriamento de aquecimento da nanoemulsão.....	91
2.3.3 Ciclo de congelamento-descongelamento da nanoemulsão.....	91
2.3.4 pH da nanoemulsão.....	91
2.3.5 Estabilidade macroscópica da nanoemulsão.....	91
2.3.4 Fotomicrografia da nanoemulsão.....	91
2.4 ATIVIDADE BIOLÓGICA DAS FORMULAÇÕES com <i>Bauhinia unguolata</i> em <i>C. elegans</i>	92
2.4.1 Estirpes e Cultura de <i>C. elegans</i>.....	92
2.4.2 Sincronização dos nematódeos.....	92
2.4.3 Preparo de placas de petri com meio de cultura (NGM) para crescimento de nematóides.....	93
2.4.4 Exposição crônica à emulsão e nanoemulsão.....	93
2.4.5 Análise de sobrevivência.....	93
2.4.6 Análise comportamental: comportamento alimentar, ritmo de	

defecação e movimento.....	94
2.4.7 Análise de reprodução.....	94
2.4.8 Análise do comprimento corporal.....	94
2.4.9 Atividade da acetilcolinesterase em <i>C. elegans</i>	95
2.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	96
2.6 MODELAGEM DE PROTEÍNAS E VALIDAÇÃO DE ESTRUTURA.....	96
2.7 ACOPLAMENTO MOLECULAR.....	97
2.7.1 <i>C. elegans</i> condições de crescimento e preparações de amostras.....	97
3 RESULTADOS E DISCUSSÕES	97
3.1 PRODUÇÃO DAS FORMULAÇÕES.....	98
3.2 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOEMULSÕES.....	98
3.3 ESTABILIDADE DAS NANOEMULSÕES.....	102
3.4 MICROSCÓPIA OPTICA.....	105
3.5 ATIVIDADE BIOLÓGICA DAS FORMULAÇÕES de <i>Bauhinia unguolata</i> EM <i>C.elegans</i>	106
3.6 MUDANÇAS COMPORTAMENTAIS.....	107
3.6.1 Ritmo de defecação e comportamento alimentar de <i>C. elegans</i> sob emulsão e nanoemulsão de OEBU.....	107
3.6.2 Comprimento corporal, desenvolvimento e reprodução de <i>C. elegans</i> sob OEBU em exposição a emulsões e nanoemulsões.....	110
3.6.3 Inibição da enzima AChE com emulsão do OEBU.....	113
3.7 ANCORAGEM MOLECULAR.....	114
4 CONCLUSÃO.....	118
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	118
REFERÊNCIAS.....	119
ANEXOS.....	123

Artigos Publicados

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é o país que possui a maior parte da biodiversidade mundial, sendo as plantas a matéria-prima para a produção de fitoterápicos. Além de substrato para a produção de medicamentos, são usadas como remédios caseiros e comunitários em práticas populares e tradicionais, processo esse conhecido como medicina tradicional. A população Brasileira é rica em diversidade cultural e étnica, na qual se obteve um acúmulo apreciável de conhecimentos e tecnologias tradicionais, que foram passados de geração a geração (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2016). Contudo, a utilização de plantas como fitoterápicos é influenciada por crenças populares, ou seja, uma das principais fontes de informação sobre a indicação de uso de espécies vegetais é o conhecimento tradicional (SCHWAMBACH; AMADOR, 2007).

O crescimento da investigação científica na área da Fitoterapia, que a milênios utiliza plantas medicinais como terapia alternativa e complementar no tratamento de doenças e sintomas tem sido evidenciado e tem ganhado interesse global (ATAKA, 2020), principalmente estudos relacionados ao tratamento de doenças neurodegenerativas (VIÉRO; DOMBROWSKI, 2022).

Muitas das plantas utilizadas como fitoterápicos possuem óleos essenciais armazenados em suas células secretoras que são constituídos principalmente por classes de substâncias tais como ésteres de ácidos graxos, fenilpropanoides mono e sesquiterpenos (ALMEIDA, 2020). São também conhecidos e utilizados desde os tempos antigos por apresentarem propriedades biológicas tais como bioinseticida, antibacteriana (SOUZA *et al.*, 2010), antifúngica (MAJOLO *et al.*, 2016), antioxidante (MAIA; DONATO; FRAGA, 2015) e antiviral (KUBIÇAL *et al.*, 2015). Muitos desses metabólitos secundários, tais como os compostos fenólicos (HUI LI *et al.*, 2020; MALAR *et al.*, 2020), terpenos, polissulfetos, quinonas, poliaminas, compostos organossulfurados podem estender a longevidade de organismos heterótrofos como o nematódeo *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*), incluindo um modelo transgênico para doença de Alzheimer (LEONOV *et al.*, 2015). Atualmente, óleos essenciais e seus constituintes têm sido alvo de estudos por seus possíveis efeitos neuroprotetores e como inibidores da Acetilcolinesterase (AChE) (MEDEIROS *et al.*, 2016; POSTUA *et al.*, 2019; HRITCU *et al.*, 2020; YAN LU, 2020; CHEM, 2020).

Um imenso conjunto de doenças humanas, tais como, diabetes, câncer, doenças do sistema cardiovascular e neurodegenerativas geralmente estão associadas ao envelhecimento que é considerado um caminho inevitável para o desenvolvimento de enfermidades e

conforme a população vai envelhecendo em todo o mundo, o aumento no aparecimento dessas doenças é extremamente grande acarretando um sério problema social e econômico (BRUNET; BERGER, 2014). Entretanto, as doenças neurodegenerativas (DN) merecem destaque, pois são patologias reconhecidas pela destruição permanente de certos neurônios, levando a perda gradual da capacidade cognitiva e das funções do sistema nervoso (FALCO *et al.*, 2016; FREITAS; OLIVEIRA, 2015).

Uma das doenças neurodegenerativas relacionadas ao envelhecimento e abordada neste trabalho é a doença de Alzheimer (DA) que atualmente representa a forma mais frequente de demência que vem aumentando ao longo dos tempos (SERENIKI; VITAL, 2008; BRUNET; BERGER, 2014; GARRE-OLMO, 2018). Esta é caracterizada por uma diminuição crônica da atividade dos neurônios, ocasionadas por uma neuroinflamação (DECANDIA *et al.*, 2023), particularmente relacionadas a redução cognitiva (BRUNET; BERGER, 2014), no entanto, ainda não se tem totalmente desvendados os mecanismos que envolvem a evolução da doença, porém, três características fisiopatológicas marcantes são observadas em pacientes com DA que são: A existência de placas senis extracelulares compostas de agregados filamentosos da proteína β -amilóide ($A\beta$) e emaranhados neurofibrilares intracelulares, formadas principalmente pela proteína tau, assim como um quadro gradativo de neurodegeneração (TRUSHINA; MIELKE, 2014; PAULA *et al.*, 2009). Categoricamente, muitos estudos relatam que a falha nos mecanismos que eliminam a $A\beta$ do cérebro pode ser a principal causa da DA (BRÜCKMANN, 2017). Por outro lado as sinapses colinérgicas estão amplamente distribuídas no sistema nervoso central (SNC) e periférico (SNP), sendo importantes para a manutenção de inúmeras funções fisiológicas humanas e neste contexto a enzima acetilcolinesterase (AChE) tem um valor significativo para o efetivo funcionamento dessas sinapses colinérgicas, pois, quando bloqueada ela é incapaz de hidrolisar a ACh, que é um neurotransmissor que atua na transmissão de informações de um neurônio a outro e assim, este neurotransmissor tende a permanecer ativo por um período maior na fenda sináptica, fato este que melhora a transmissão colinérgica (SILVA; GONSALVES, 2016). Além disso, diferentes estudos mostram relações citotóxicas causando o aumento dos agregados β -amilóide quando complexados com a enzima AChE. A agregação de $A\beta_{40}$ foi influenciada pela adição da enzima AChE, acelerando significativamente o status de agregação e aumento a toxicidade associada com a formação dos complexos AChE-amilóide (BARTOLINI *et al.*, 2003; REYES *et al.*, 2004).

O uso de inibidores da colinesterase (IChE) são as principais drogas atualmente licenciadas para o tratamento específico da DA. Hoje no mercado existem alguns

medicamentos aprovados pelo FDA (Food and Drug Administration), como Tacrina, Donepezil, Rivastigmina e Galantamina, capazes de reduzir os efeitos causados pela doença. No entanto, alguns destes podem causar efeitos indesejáveis aos pacientes em tratamento, dentre eles distúrbios gastrointestinais e cardiovasculares como náuseas, vômitos, diarreia, anorexia, dispepsia, dor abdominal, aumento da secreção ácida, pressão arterial flutuante, síncope, arritmia, bradicardia, tontura, dor de cabeça, agitação, insônia, cólicas, sudorese e aumento da secreção brônquica (VIEGAS Jr., 2004; FORLENZA, 2005; OLIVEIRA *et al.*, 2018). Além disso, os fármacos aprovados para o tratamento dessa patologia, apenas retardam os sintomas cognitivos e sua evolução natural, o qual promovem estabilidade ou melhora temporária do quadro clínico, porém, alguns indivíduos não respondem ao tratamento (NETO *et al.*, 2014; VIDAL; ZHANG, 2021).

Um dos setores da nanotecnologia com maior potencial de aplicação são os sistemas de carregamento e liberação de drogas (BERGMANN, 2008). Nesse contexto as nanopartículas, vem adquirindo ênfase no meio tecnológico, pois possuem tecnologia controlada de fármacos (FERREIRA, 2018) e pode contribuir para o avanço da saúde humana (LINDNER, 2014). Medicamentos nanoencapsulados possuem a capacidade de efeito de permeação e retenção aumentados em tecidos acometidos por tumores e outros processos inflamatórios, de maior permeação transdérmica, além de ultrapassar a barreira hematoencefálica (BHE), entre outras vantagens (APOLINÁRIO *et al.*, 2020), embora esta última seja o maior desafio encontrado pela indústria farmacêutica (FERREIRA, 2018), dentre os sistemas de nanopartículas, daremos ênfase às nanoemulsões.

Entre as incontáveis espécies de plantas com fins fitoterápicos destaca-se a espécie em estudo *Bauhinia unguolata* (BU) pertencente à família Fabaceae, muito estudada pela sua ação hipoglicemiante, ou seja, sua capacidade de reduzir os níveis de glicose (LORENZI, MATOS 2008, VAZ; TOZZI 2003, VAZ, 2020). No Brasil esta espécie é conhecida popularmente como pata-de-vaca (SILVA; CECHINEL, 2002; LORENZI; MATOS, 2002; VAZ, 2020). Além da

ação hipoglicemiante, são utilizadas no controle do colesterol, como diurético, expectorante (CORRÊA, 1998), atividade antioxidante, anti-inflamatória (RODRIGUES, 2019), atividade larvicida contra o mosquito *Aedes aegypti* (SILVÉRIO *et al.*, 2020), antiinflamatória e antiacetilcolinesterase (MEDEIROS, 2016; SANTOS *et al.*, 2011).

Diante do exposto, este estudo tem como objetivo analisar as interações de nanoemulsões do óleo essencial de *Bauhinia unguolata*, e seus possíveis efeitos de inibição da enzima Acetilcolinesterase (AChE), in vivo e in vitro, bem como seu potencial biológico no

tratamento da DA, utilizando como organismo o nematódeo *C. elegans*, que é um verme de vida livre que possui 80% do genoma humano e tem se destacado como organismo modelo para uma gama de processos biológicos, como morte celular programada, neurobiologia, interferência de RNA, desenvolvimento e envelhecimento (RIECKER; LOPES, 2016).

1.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral deste trabalho é avaliar a atividade protetora do óleo essencial de *Bauhinia unguolata* (Fabaceae) in vitro e in vivo por meio de modelos de Alzheimer utilizando o nematódeo *Caenorhabditis elegans*.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ❖ Extrair o óleo o óleo essencial de *Bauhinia unguolata* e caracterizar a composição química do OEBU;
- ❖ Avaliar a capacidade inibitória da enzima AChE in vitro e in vivo do OEBU;
- ❖ Analisar a interação entre os compostos presentes no OEBU e a enzima AChE por meio dos métodos de titulação em RMN de ^1H ;
- ❖ Realizar a ancoragem molecular para verificar a interação entre os compostos do OEBU e os sítios ativos da enzima AChE e CATs para corroborar os resultados;
- ❖ Determinar a atividade antioxidante do OEBU;
- ❖ Avaliar a atividade biológica do OEBU por meio de ensaios in vivo utilizando o nematódeo *Caenorhabditis elegans*.

1.3 JUSTIFICATIVA

O tratamento não invasivo eficaz de doenças neurológicas é muitas vezes limitado pelo acesso deficiente de agentes terapêuticos ao sistema nervoso central (SNC). A maioria das drogas e agentes biotecnológicos não penetra facilmente no parênquima cerebral devido à presença de barreiras dinâmicas anatômicas e bioquímicas: a barreira hematoencefálica. Portanto, um dos desafios mais significativos enfrentados pelo desenvolvimento de medicamentos para o SNC é a disponibilidade de uma tecnologia de direcionamento cerebral eficaz. Avanços recentes em nanotecnologia forneceram soluções promissoras para esse desafio. Vários nanocarreadores que vão desde os sistemas mais estabelecidos, por exemplo, nanopartículas poliméricas, nanopartículas lipídicas, lipossomas, micelas para os sistemas mais novos, por exemplo, dendímeros, nanogéis e nanoemulsões e nanosuspensões têm sido

estudados para a entrega de terapêuticas do SNC. A espécie *Bauhinia unguolata*, é uma planta muito utilizada na medicina tradicional para o tratamento do diabetes, entretanto pesquisas mostraram efeitos eficazes de extratos dessa planta para doenças relacionadas ao estresse oxidativo. Portanto este trabalho tem como intuito produzir nanoemulsões do óleo essencial de *Bauhinia unguolata* que possam ser utilizadas no tratamento do Alzheimer.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 GÊNERO *Bauhinia*

Este gênero é considerado o mais complexo da tribo Cercideae, com aproximadamente 160 espécies distribuídas nas regiões tropicais e subtropicais da Ásia, África, Austrália, América Central e do Sul. No Brasil ocorrem 61 espécies, das quais 39 são endêmicas e apresentam grande plasticidade fenotípica, e diferentes tratamentos taxonômicos foram propostos. As principais características deste gênero são hábitos arbóreo ou arbustivo, às vezes possuem espinhos intra estipulares, porém nunca com gavinhas, seu cálice é espatáceo ou apresenta-se dividindo o hipanto em 2 a 5 lobos (PEREIRA, 2018).

2.1.1 Espécie *Bauhinia unguolata*

A espécie *Bauhinia unguolata* pertence à família fabaceae, Caesalpinioideae, Cercideae. São arbustos que podem medir de 2 a 7 m de altura (COLÍN; STEFANO, 2009), Figura 1.

Figura 1. Espécie *Bauhinia unguolata* em seu habitat natural.



Fonte:

Autora.

No Brasil esta espécie se estende desde a floresta amazônica até as florestas de refúgio no estado do Ceará, Região Centro-Oeste e parte da região Sudeste (VAZ, 2003; TOZZI, VAZ, 2020), conforme Figura 2. Seu nome em latim, significa casco ou pata de bovino, devido ao formato de suas folhas que se assemelham ao casco da pata do boi (LORENZI; MATOS, 2008). Possui como habitat, margens de rios, floresta com campos, floresta seca de savana, cerrado, na encosta da serra da Lua, campos alagados periodicamente, área de carrasco, caatinga arbórea, cerradões entre outras (VAZ; TOZZI, 2003; VAZ, 2020).

Figura 2. Distribuição geográfica da espécie *Bauhinia unguolata* no Brasil.



Fonte: Adaptado de Flora e Funga do Brasil (2022). Estende-se desde a região Nordeste em laranja (Ceará, Maranhão e Piauí), Região Centro-Oeste em amarelo (Distrito Federal, Goiás, Mato Grosso do sul e Mato Grosso, Região Norte em verde (Acre, Amazonas, Amapá, Pará, Rondônia, Roraima, Tocantins) e Região Sudeste em vermelho (Minas Gerais e São Paulo).

Esta espécie apresenta características tais como folhas bifoliadas, mesófilo dorsiventral, epiderme com superfície abaxial papilosa, estômatos anomocíticos ao nível da epiderme e tricomas tectores (PEREIRA *et al.*, 2018) entre 3,8 e 17 cm de comprimento medindo de 3 e 10 cm de largura, são lobadas até o meio do seu comprimento, ovalada-lanceolada, o ápice dos lobos são agudos, subcordado de base para arredondado; possuem de 7 a 9 veias. Suas inflorescências (flores) tem racemos curtos, com 10 a 30 flores, as flores são bissexuais e hipanto de 8 a 17 mm de comprimento, 4 a 9 mm de largura, tubular, ferruginoso; cálice de 3 a 4 cm de comprimento, espatáceo, com 2 a 4 partes, lobos em espiral, estrigulose, ferruginosos, reflexos, na antese; as pétalas possuem de 2 a 3 cm de comprimento, 0,2 cm de largura, séssil, linear, patente, branca. Estames férteis, de 2,8 a 4 cm de comprimento, sem

estaminódios; ovário tomentoso, ferruginoso, e as flores masculinas são semelhantes. A Leguminosa (fruto) mede de 10 a 17 cm de comprimento e 1 cm de largura, elasticamente deiscente, linear, estriçulose; as sementes possuem 6 mm de comprimento, 4 mm de largura, oblongo-elíptico (COLLIN *et al.*, 2009), possuem estômatos anomocíticos ao nível da epiderme, tricomas tectores (Pereira *et al.*, 2018). A Figura 3 representa o arbusto e partes da espécie *Bauhinia unguolata*.

Figura 3. Arbusto e partes da planta *Bauhinia unguolata*.



Fonte: Autora. (A) arbusto medindo de 2 a 7m de altura, em (B) folhas verdes pontiagudas é a sua principal característica, em (C) o fruto com sementes e sua flor na cor branca em (D).

Estudos corroboram que esta espécie possui um grande potencial biológico, além de baixar o nível de glicose, diminui também o colesterol e os triglicerídeos, assim como foi relatado a presença de insulina nos cloroplastos das células foliares desta planta (LORENZI; MATOS, 2008).

2.2 DOENÇA DE ALZHEIMER

Um dos primeiros estudos que descreveu essa patologia foi publicado há mais de um século pelo psiquiatra e neuropatologista alemão Alois Alzheimer. Muitos dos sintomas relatados abrangiam falhas na memória recente, perturbações psíquicas e desordens

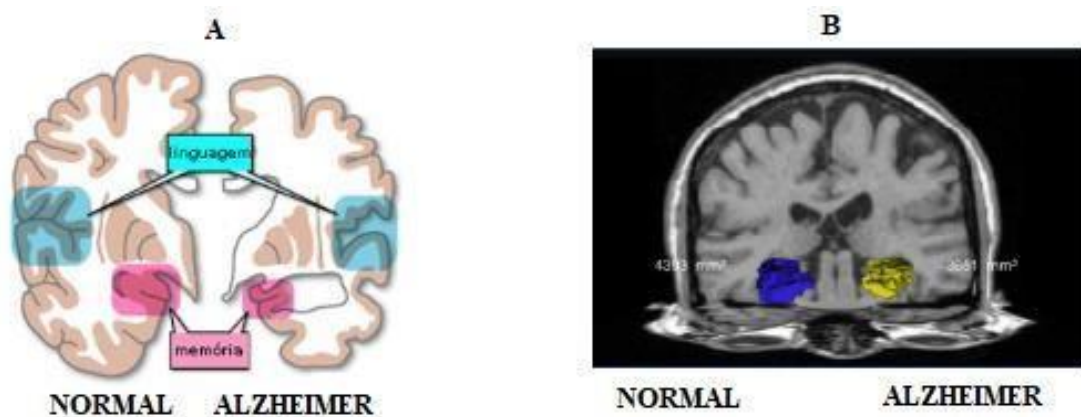
comportamentais e de linguagem, bem como um cérebro atrofiado e com evidências de deposições proteicas anômalas, sendo estes dois últimos observados em exames *post-mortem* e posteriormente denominadas placas senis e emaranhados neurofibrilares (FALCO, 2016).

A Doença de Alzheimer (DA) é a forma mais frequente dentre as demências existentes, em torno de 50% a 60% do total delas (ALMEIDA; PEREIRA, 2020) e afeta principalmente a regiões do cérebro relacionadas à cognição, como o córtex cerebral e o Hipocampo e sua predominância está entre a população idosa (HOFRICHTER, 2013), pois estudos revelam que 0,7% das pessoas com sintomas da DA possuem entre 60 e 64 anos, 5,6% estão entre 70 e 79 anos e em torno de 38,6% está entre os idosos acima de 90 anos. No mundo, aproximadamente 50 milhões de pessoas apresentam demência e é previsto um número de 65,7 milhões de casos no ano de 2030 (ALMEIDA; PEREIRA 2020) e em 2050 passe para 150 milhões de pessoas afetadas. (VIDAL; ZHANG, 2021).

A DA pode ser dividida em duas formas: a DA de início tardio (LOAD - do inglês, *Late Onset Alzheimer Disease*) e a DA familiar (FAD - do inglês, *Familial Alzheimer's Disease*). A FAD é caracterizada pelo surgimento antecipado, e, por tanto também é chamada de DA de início precoce (do inglês, *Early Onset Alzheimer's Disease*), sucedendo antes dos 60 anos, é menos estudada, porém tem forte indício de mutações genéticas (transmissão mendeliana autossômica dominante), e representa de 1 a 6% de todos os casos de DA. A LOAD, representa a forma mais comum da doença e é caracterizada por surgir tardiamente após os 60 anos (BEKRIS, 2010; UDDIN *et al.*, 2020).

A dificuldade na linguagem e a perda de memória recente, como não lembrar de ações do cotidiano, ou reconhecer parentes e amigos, são os principais sintomas que surgem na DA. Estudos com a utilização de ressonância magnética e biomarcadores da β -amilóide, mostram que a perda de volume no cérebro implica no comprometimento da memória e a degeneração do córtex entorrinal (SCHMITZ *et al.*, 2016). A Figura 4 mostra o cérebro normal e com Alzheimer, além das áreas do cérebro responsáveis pela linguagem e a memória, que são afetadas nos indivíduos acometidos pela doença e o cérebro de um paciente de 62 anos com DA, com diminuição do hipocampo esquerdo em relação ao direito passando de 4393 mm para 3651 mm.

Figura 4. Desenho e imagem das regiões do cérebro normal e com Alzheimer.



Fonte: Adaptado, MORENA; KIHARA (2016) e ROJAS et al. (2016). Em (A) as áreas que são afetadas pela doença, como a linguagem e a memória e em B imagem de um cérebro de um paciente de 62 anos com DA, exibindo uma diminuição do hipocampo esquerdo em (amarelo) em relação ao direito em (azul), passando de 4393 mm para 3651 mm.

2.2.1 A hipótese da cascata amilóide

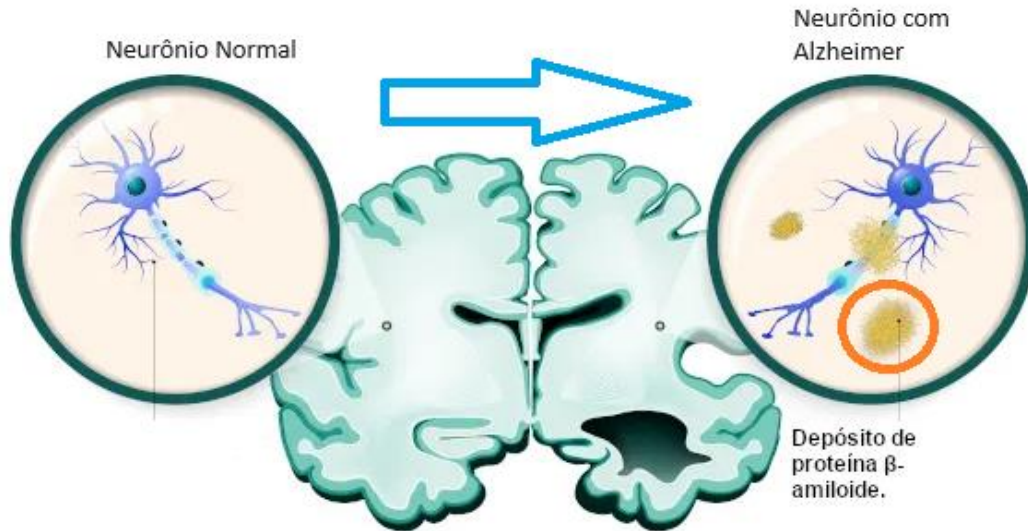
Duas características patológicas da DA envolvem o acúmulo de placas amilóides extracelulares e os emaranhados intraneuronais de uma forma agregada da proteína Tau (VIEIRA *et al.*, 2014; DREW, 2018).

A hipótese que mais predominante no campo da DA é a hipótese da cascata amilóide que alega que a deposição de peptídeo β -amilóide ($A\beta$) no Sistema nervoso central (SNC) inicia uma cascata de fenômenos moleculares que causam neurodegeneração celular, levando ao aparecimento e progressão da Doença (ERIKCSON; BANKS, 2013).

O $A\beta$ possui de 36 a 43 aminoácidos de comprimento e é um produto do processamento proteolítico da proteína APP (FALCO, 2016). A proteólise da APP por α -secretase ou β -secretase leva à secreção de fragmento solúvel peptídeo amilóide- α ou amilóide- β de fragmento solúvel, esses fragmentos podem ser quebrados pela γ -secretase liberando extracelularmente o peptídeo $A\beta$ e intracelularmente um fragmento citoplasmático identificado como precursor amilóide (BEKRIS *et al.*, 2010).

O equilíbrio na produção e depuração do peptídeo $A\beta$ é um processo importante para desvendar a complexa hipótese da cascata amiloide (DELANOGARE *et al.*, 2019). Esta hipótese deve-se ao processamento proteolítico da proteína precursora da $A\beta$ (APP) por β - e γ -secretases no qual resulta na produção de $A\beta$, está se agrega dando origem a um número de espécies $A\beta$ potencialmente tóxicas. A agregação da $A\beta$ forma fibrilas amiloides, que constituem o núcleo de placas senis, que é a principal característica da doença, na Figura 5 observa-se os neurônios sadios sem DA e com agregação da β -amilóide.

Figura 5- Neurônios normais e com agregação dos peptídeos A β .



Fonte: Adaptado de SANTOS, V. S. "Alzheimer"; *Brasil Escola*. Disponível em: <https://brasilecola.uol.com.br/doencas/alzheimer.htm>. Acesso em de janeiro de 2024.

As espécies de monômeros e oligômeros da A β são tóxicas para os neurônios e independe da formação de placas, sendo assim, embora haja um número maior de placas senis, isto não implica no aumento do grau de demência clínica em pacientes, contudo o nível de A β 42 no cérebro está extremamente associado com os sinais clínicos de demência. A degeneração dos neurônios e a disfunção sináptica desencadeada por A β neurotóxicas, acarreta atrofia do cérebro de pacientes acometidos pela DA levando ao comprometimento cognitivo, comportamental e social (HOFRICHTER, 2013). Além disso, a aglomeração de peptídeos A β no cérebro está correlacionada a uma enorme resposta inflamatória e ao longo do tempo, também são observadas condições de estresse oxidativo, homeostase iônica alterada e uma série de mudanças bioquímicas adicionais. Esta cascata patológica acarreta na disfunção sináptica neuronal generalizada e morte celular (DELANOGARE *et al.*, 2019).

Atualmente, os alvos mais evidentes de tratamento da DA é a intervenção na cascata A β que integra a inibição do processamento de APP e produção de A β (HOFRICHTER, 2013), na qual consiste em bloquear a sua agregação e o processo inflamatório, resultando na inibição da inflamação e neurotoxicidade induzida pela A β .

Apesar dessa hipótese ser o mecanismo mais aceito para explicar a DA, na qual foi formulada a partir de evidências patológicas (DELANOGARE *et al.*, 2019), até agora, nenhum fármaco mostrado no momento conseguiu reverter, bloquear ou mesmo retardar o

avanço da doença (DREW, 2018).

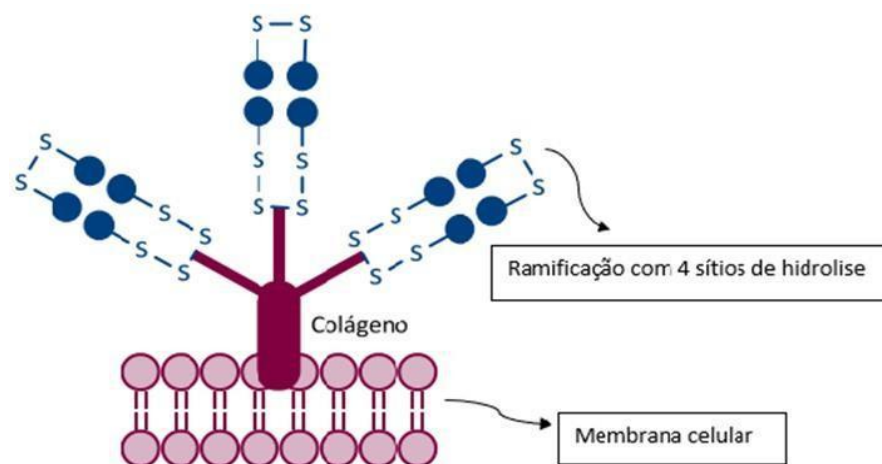
2.2.2 Hipótese colinérgica

A hipótese colinérgica defende várias características, uma delas, é o baixo nível na concentração da colina acetiltransferase (ChAT) que é a enzima responsável pela síntese da acetilcolina (ACh), no córtex e no hipocampo, bem como uma notável redução variável de neurônios colinérgicos localizados no núcleo basal (SERENIK, 2008; FALCO, 2016).

Segundo Morais *et al* (2013) a restauração da função colinérgica é base para o tratamento da DA, sendo seu objetivo principal a estabilização dos níveis de (ACh) que é um neurotransmissor essencial para os processos cognitivos (Ministério da Saúde, 2013, PENIDO *et al.*, 2017) e para que isto ocorra deve haver uma diminuição na degradação da ACh promovido por inibidores da enzima AChE, pois esta é a enzima responsável pela degradação da ACh (PENIDO *et al.*, 2017).

A enzima AChE tem a função de hidrolisar o neurotransmissor ACh nas sinapses colinérgicas e apresenta três ramificações, ligadas por pontes dissulfeto, fixadas à membrana celular por colágeno. Cada ramificação é uma unidade enzimática formada por quatro subunidades de proteínas, capazes de hidrolisar a ACh, resultando desta forma, num total de 12 sítios ativos por enzima (ARAUJO; SANTOS; OLIVEIRA, 2016), como mostra a Figura 6.

Figura 6 - Esquema da enzima AChE.



Fonte: adaptado de ARAUJO; SANTOS; OLIVEIRA (2016). Esta enzima apresenta três ramificações, ligadas por pontes dissulfeto (S-S) fixadas à membrana celular por colágeno (roxo). Cada ramificação é uma unidade enzimática formada por quatro subunidades de proteínas.

2.3 PLANTAS MEDICINAIS E ALZHEIMER

As plantas medicinais há muito tempo são vistas como uma reserva de saúde e estão sendo utilizadas no tratamento e prevenção de doenças e enfermidades humanas. Atualmente, muitas delas são alvos de investigação como fonte de novos compostos naturais biologicamente ativos e avaliadas quanto às suas atividades farmacológicas (ARYA, 2021; MONTEIRO; BRANDELLI, 2017).

Dietas ricas em antioxidantes ou o uso de plantas antioxidantes a partir de tratamentos fitoterápicos, constituem uma tendência atual no tratamento de doenças neurodegenerativas. Isto se deve ao estresse oxidativo, que também é um importante representante causador da DA. O estresse oxidativo pode aumentar os níveis de espécies reativas de oxigênio (EROs), além do próprio envelhecimento que também contribui para essa elevação (RAPAKA *et al.*, 2019).

2.4 ÓLEOS ESSENCIAIS

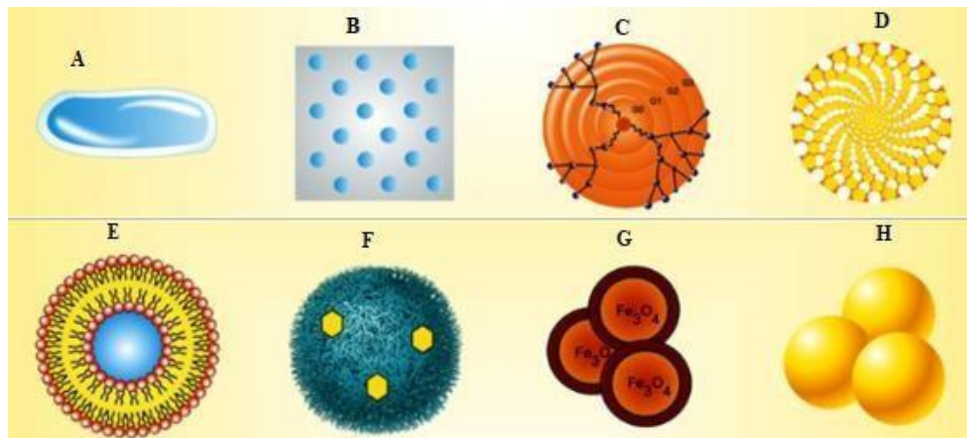
Os óleos essenciais são líquidos odorantes imiscíveis em água de composição complexa provenientes de vegetais aromáticos, e podem ser obtidos por condução de vapor de água, destilação a seco ou por métodos mecânicos adequados. Podem ser biossintetizados como metabólitos secundários em diferentes partes da planta, tais como flores, botões, folhas, frutos, galhos, cascas, sementes, rizoma e raízes. São habitualmente lipofílicos de natureza hidrofóbica, solúveis em solventes orgânicos e possuem densidade em geral inferior à da água (ASBAHANI *et al.*, 2015). Quanto ao rendimento depende da parte do vegetal utilizada, dos fatores sazonais, como estação do ano, horários de coleta, assim como a espécie da planta em estudo (RIBEIRO; BONILLA; LUCENA, 2018) sendo geralmente inferior a 1%, fato este que os torna economicamente valiosos (ASBAHANI *et al.*, 2015).

2.5 NANOTECNOLOGIA

Recursos terapêuticos para tratar as enfermidades do sistema nervoso central (SNC) são um desafio para muitos pesquisadores. A existência de barreiras fisiológicas, especialmente a barreira hematoencefálica (BHE) que limita a entrada ao cérebro de substâncias e impede a eficácia de muitas terapias medicamentosas. Portanto é essencial direcionar o fármaco para o cérebro, sobretudo especificamente para as células doentes e que ultrapassem as barreiras fisiológicas. A nanotecnologia tem revolucionado a muitas áreas da ciência, em especial a nanotecnologia farmacêutica, apresentando inúmeras técnicas com vantagens promissoras na produção de novos medicamentos. Por exemplo, os nanocarreadores como lipossomas, nanopartículas, nanogéis, dendrímeros, nanoemulsões, polímeros,

e pontos quânticos para entregar medicamentos ao cérebro que visam melhorar e tornar eficaz, bem como minimizar os efeitos colaterais da terapêutica cerebral além de serem capazes de transportar ativos ao sistema nervoso central e ultrapassarem a BHE (ALEXANDER, 2019, PANTEL, 2017). Esses sistemas de carregamento e liberação de drogas detêm um dos maiores potenciais de aplicação da nanotecnologia para melhoria e eficácia terapêutica de fármacos e é uma das áreas da indústria farmacêutica mais promissoras (SILVA *et al.*, 2021), levando-se em conta o alto custo do desenvolvimento de novas moléculas ativas, haja visto que uma nova formulação em nanopartículas pode resgatar drogas com potencial biológico, que foram descartadas após grandes investimentos por causarem possíveis efeitos colaterais ou por terem baixa biodisponibilidade, além de gerar novas patentes (BERGMAN, 2008). Apresenta a estrutura geral de alguns sistemas nanocarreadores utilizados para entrega de medicamentos até o cérebro estão representadas na Figura 7.

Figura 7 - Estrutura geral de nanocarreadores utilizados para direcionar os agentes farmacológicos ou princípio ativo até o cérebro.



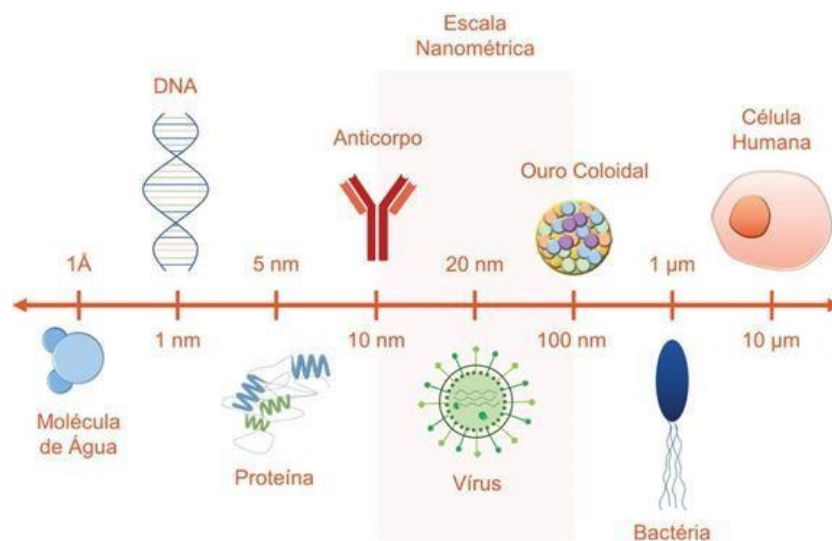
Fonte: ALEXANDER *et al.* (2019). Sistemas de nanogel (A), nanoemulsão(B), dendrímero (C), pontos quânticos (D), lipossomas (E), nanopartículas poliméricas (F), nanopartículas inorgânicas como o óxido de ferro(G) e (H) nanopartículas de ouro.

Frente dos potenciais efeitos benéficos obtidos com o uso da nanotecnologia, a indústria farmacêutica tem sido incentivada a utilizá-la principalmente para a produção de nanomedicamentos voltados para o tratamento de doenças tais como o Alzheimer (AMORIM 2014; SILVA 2020, ZUGLIANELLO, 2021), Parkinson entre outras, uma vez que os atuais tratamentos para essas doenças ocasionam vários efeitos colaterais e nem sempre possui a eficácia desejada (SILVA, 2020).

Este trabalho terá como foco o sistema nanoestruturado de nanoemulsões que possuem diâmetro médio de gota em tamanho nanométrico, os quais são classificadas como dispersões

coloidais estáveis com sistema constituído por óleo e água, e um ou mais agentes surfactantes, formando sistemas multifásicos, podendo ser óleo em água (o/a) ou água em óleo (a/o) (DALT et al., 2013; PORTO., 2015, APOLINARIO, 2020), além de apresentarem uma boa estabilidade cinética, em virtude do tamanho da gota ser reduzida. A fase aquosa pode conter componentes ativos e conservante hidrofílicos, farmacêuticos ou cosméticos, enquanto a fase oleosa é habitualmente composta por óleo mineral, óleo de silicone, óleo vegetal, ésteres, ácidos graxos ou ingredientes ativos lipofílicos (DALT *et al.*, 2013, APOLINÁRIO, 2020). As nanoemulsões, podem aumentar a permeabilidade de um ativo pouco solúvel (DALT *et al.*, 2013), bem como encapsular, proteger e liberar componentes bioativos lipofílicos e vem sendo cada vez mais utilizados nas indústrias farmacêuticas (BRUXEL, 2012; PIRES; MOURA, 2017). São constituídas por partículas inferior a 200 nm (SPERANDIO, 2020). A Figura 8 representa esquematicamente a escala nanométrica comparando o tamanho de moléculas atômicas e estruturas bioquímicas.

Figura 8 - Faixa de escala manométrica.



Fonte: APOLINÁRIO *et al.* (2020). Começando desde a água, passando por proteínas e células virais até a escala macrométrica de células humanas.

Para a produção de nanoemulsões é sempre requerido a aplicação de alguma energia externa para converter os componentes separados em uma dispersão coloidal, pois são sistemas termodinamicamente instáveis. Ao menos, uma entrada de energia que exceda a energia livre positiva associada ao aumento da área de contato entre as fases de óleo e água. A forma como a energia externa é aplicada para formar uma nanoemulsão depende do método

de preparação utilizado. Os métodos a serem aplicados podem ser amplamente categorizados como de alta ou baixa energia, dependendo do mecanismo físico-químico usado para a ruptura das gotículas (BRUXEL, 2012).

Os métodos de alta energia utilizam dispositivos mecânicos como os homogeneizadores que são capazes de gerar intensas forças que misturam as fases de óleo e água para que haja a formação de pequenas gotículas, tais mecanismos podem ser performados por homogeneizadores de válvula de alta pressão, os microfluidizadores e os sonificadores. Os métodos de baixa energia dependem da formação espontânea de minúsculas gotículas de óleo em sistemas mistos surfactantes – óleo e água quando a solução ou as condições ambientais são alteradas como, métodos de inversão de fase e emulsificação espontânea (MCCLEMENTS, 2012).

REFERÊNCIAS

- ALEXANDER, A.G., et al. Uso de *Caenorhabditis elegans* como modelo para estudar a doença de Alzheimer e outras doenças neurodegenerativas. Frente. **Genet.** n.5, p.279, 2014.
- ALMEIDA, Jonathan Resende de. **Planejamento, Ensaio e Otimização in Silico de Novos Protótipos Inibidores da Enzima Acetilcolinesterase.** Orientador; Carlos Henrique Tomich de Paula da Silva. 2015. 156f. Tese de (doutorado) apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto- Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.
- APOLINÁRIO, C. A., et al. Abrindo a caixa de pandora dos nanomedicamentos: Há realmente muito mais ‘espaço lá embaixo’ **Quim. Nova**, v. 43, n. 2, p. 212-225, 2020
- ARYA, A. et al. Acetylcholinesterase Inhibitory Potential of Various Sesquiterpene Analogues for Alzheimer’s Disease Therapy. **Biomolecules**, v. 11, P. 350, 2021
- ASBAHANI. E. A. Essential oils: From extraction to encapsulation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 483, p. 220-243, 2015.
- ATAKA K; TAKAHASHI, R; BO LI, J; IIZUKA, N; INUI, A. Editorial: Frailty and herbal medicines- From Molecular Mechanisms to Clinical Efficacy. **Frontiers in Nutrition**, v. 7, n. 41, 2020.
- BEKRIS, M. L; YU. C; BIRD. D. T; TSUANG. W. D. Genetics of Alzheimer Disease. **J Geriatr Psychiatry Neurol**, v. 23. N .4. p. 213-227. 2010.
- BERGMANN, R.B. A nanotecnologia: Da Saúde para Além do Determinismo Tecnológico. **Rev Ciências e Cultura**, v.60, n.2. São Paulo, 2008.
- BRUNET, A; BERGER. S. Epigenetics of Aging and Aging-related Disease. **Journals of Gerontology: Biological Sciences** v. 69, p. 17-20, 2014.
- CALDICOTT, I.M., LARSEN, P.L; RIDDLE, D.L. (1994). In: Cell biology: a laboratory handbook. (San Diego: Academic Press), pp. 389. Stiernagle, T. Maintenance of *C. elegans* (February 11, 2006), *WormBook*, ed. The *C. elegans* Research Community, WormBook, doi/10.1895/wormbook.1.101.1, <http://www.wormbook.org>.
- CHARÃO, Mariele Feiffer. **Avaliação toxicológica de nanocápsulas de núcleo lipídico e estudo da eficiência de nanocápsulas contendo melatonina na proteção frente ao dano causado pelo paraquat.** Orientadora: Solange Cristina Garcia. 2015. 156f. Tese de (doutorado) Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Universidade Federal do Rio Grande do Sul Faculdade de Farmácia. RS. Porto Alegre, 2015.
- CHEN.Y.X., et al. Essential Oil of *Acorus tatarinowii* Schott Ameliorates A β Induced Toxicity in *Caenorhabditis elegans* through an Autophagy Pathway, **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, p.11, 2020.

COLÍN, T. R; STEFANO. D. R; CAN. L. L. El género *Bauhinia* (Fabaceae, Caesalpinioideae, Cercideae) en la península de Yucatán (México, Belice y Guatemala), **Revista Mexicana de Biodiversidad**, n.80, p.293- 301, 2009.

CORSI, K. A; WIGHTMAN. B; CHALFIE. M. A Transparent Window into Biology: A Primer on *Caenorhabditis elegans*, **Genetics**, V. 200, p.387–407, 2015.

DALT, M. R., et al. A nanotecnologia como estratégia para o desenvolvimento de cosméticos. **Ciência e Cultura**, v. 65, n.3. São Paulo, 2013.

DECANDIA, D. et al. Dietary Protection against Cognitive Impairment, Neuroinflammation and Oxidative Stress in Alzheimer's Disease Animal Models of Lipopolysaccharide-Induced Inflammation. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 6, p. 5921, 21 mar. 2023.

DELANOGARE. E.,et al. Hipótese amilóide e o tratamento da doença de Alzheimer: Revisão dos estudos clínicos realizados, **Vitalle - Revista de Ciências da Saúde**, v.31, n.1, 2019.

FALCO, A., et al. Doença de alzheimer: Hipóteses etiológicas e perspectivas de tratamento. **Química Nova**, Vol. 39, No. 1, p. 63-80. 2016.

FERRARI, C., et al. Ephemeral-habitat colonization and neotropical species richness of *Caenorhabditis* nematodes, **BMC Ecology**, n. 17, p. 43, 2017.

FORLENZA, O.V. Tratamento farmacológico da doença de Alzheimer. **Revista de Psiquiatria Clínica**, n.32 v.3, p.137-148, 2005.

FUENTES, F; VERDÚ, S; FUENTES, A; RUIZ, J. M; BARAT, M. J., et al. Effects of exposure of essential oil components on biological parameters of *Caenorhabditis elegans*. **Food and cahemical Toxicology** v. 159, 2022.

GARCÍA, G. A. P, et al. Bacterial Metabolism Affects the *C. elegans* Response to Cancer Chemotherapeutics. **Cell**. nº. 169, v.3, p.431-441, 2017.

GARRE-OLMO, J. Epidemiología de la enfermedad de Alzheimer y otras demencias. **Rev Neurol**, v. 66, n. 11, p. 77-386, 2018.

GONZALES, M. L; ROIG, A; LAROMAINE, A. C. *elegans* as a tool for in vivo nanoparticle assessment. **Genetics**, V. 219, p. 10-26, 2015.

GRAMOSA. V. N; FREITAS. B. V. J; NETO. L. N. M; SILVEIRA. R. E; NUNES. P. E. Volatile Components of the Essential Oil From *Bauhinia unguolata* L. **Journal of Essential Oil Research**, v. 21, n. 6, p. 495-496, 2009.

GROTO, W. Z. H. Iron physiology and metabolism. Re. **Bras. Hemato.Hemoter.** v.32, sspl. 2, 2010.

GUBERT, P., et al.; Aschner. Metabolic effects of manganese in the nematode

Caenorhabditis elegans through DAergic pathway and transcription factors activation. **NeuroToxicology**, 2018.

HOFRICHTER, J. et al. Reduced Alzheimer's disease pathology by St. John's wort treatment is independent of hyperforin and facilitated by ABCC1 and microglia activation in mice. **Curr Alzheimer Res**, v. 10. p. 1057-1069.

HRITCU, L., et al. (-)-cis-Carveol, a Natural Compound, Improves β -Amyloid Peptide 1-42-Induced Memory Impairment and Oxidative Stress in the Rat Hippocampus. **BioMed Research International**. 2020.

J.R, LAKOWICZ, Principles of Fluorescence Spectroscopy, 3rd ed., Springer, New York, p. 238–264, 2006.

J. XU, J. LIU, X. ZHU, Y. YU, S. Cao, Novel inhibitors of tyrosinase produced by the 4-substitution of TCT, **Food Chem**. n.221, p.1530–1538, 2017.

KUBIÇAL, F.T., et al. Atividade in vitro de plantas condimentares (*Rosmarinus officinalis* L., *Lippia graveolens* HBK e *Tymus vulgaris* L.) contra o calicivírus felino **Revista de Ciências Farmacêutica Básica Aplicada**, v.36(1), p.117-122. 2015.

LAKOWICZ, J.R., Principles of Fluorescence Spectroscopy, 3rd ed., **Springer**, New York, p. 238–264, 2006.

LEITE, Natasha Rios. **Composição química e efeitos de frutos do Cerrado sobre o estresse oxidativo, longevidade e doença de Alzheimer em *Caenorhabditis elegans***. 2018. 87f. Tese de (Mestrado) Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde- Universidade Federal da Grande Dourados, Faculdade de Ciências da Saúde, Grande Dourados, MS, 2018.

LEITERITZ, A; SCHMIEDL. T; BAUMANN, S; WENZEL. U. Amyloid-beta induced paralysis is reduced by cholecalciferol through inhibition of the steroid signaling pathway in an Alzheimer model of *Caenorhabditis elegans*. **nutritional neuroscience** v. 24, p. 82-89, 2021.

LEONOV, A., et al. Longevity Extension by Phytochemicals. **Molecules**. v. 20, p. 6544-6572, 2015.

LI, H; Yu, X; LI, C; MA, L; ZHAO, Z; GUANA, S., et al. Caffeic acid protects against A β toxicity and prolongs lifespan in *Caenorhabditis elegans* models. **Food Funct**. v.12, p.1219,2021.

LINDNER Gabriela da Rocha. **Desenvolvimento de nanopartículas poliméricas contendo Resveratrol e avaliação da ação neuroprotetora sobre um modelo experimental de doença de Parkinson**. Orientador; Rubiana Mara Mainardes. 2014. 125f. Dissertação de (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Universidade Estadual do Centro- Oeste, Guarapuava, SP, 2014.

LORENZI, H; MATOS. F.J. A. **Plantas Medicinais: no Brasil: nativas e exóticas**, 2 ed, Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2008.

MAIA, F. T; DONATO.A; FRAGA.E.M. Atividade Antifúngica de Óleos essenciais de Plantas. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**. Campina Grande, v.17, n.1, p.105-116, 2015.

MAJOLO, C., et al. Composição Química e Atividade Antibacteriana de óleos Essenciais. Embrapa Amazônica, Manaus, AM. 1 ed, p.34, 2016.

MALAR, S. D., et al. Vitexin prevents A β proteotoxicity in transgenic *Caenorhabditis elegans* model of Alzheimer's disease by modulating unfolded protein response. **Journal of Biochemical and Molecular Toxicology**. p. 1-6, 2020.

MATOS. F.J.A. **Plantas Mediciniais-guia de seleção e emprego de plantas usadas em fitoterapia no nordeste do Brasil**. 3.ed, Imprensa Universitária/Edições UFC, Fortaleza, 2007.

MEDEIROS, A.N.R.S., et al. Fitodisponibilidade de metais, composição química e ensaios biológicos no óleo de *Bauhinia unguolata* L. (FABACEAE). **Journal of Medicinal Plants Research** 2016.

MINISTÉRIO DA SAÚDE - Política e Programa Nacional de Plantas Mediciniais. Brasília, DF, 2016.

MORAIS, S. A. L. influência dos fatores abióticos na composição química dos óleos essenciais. **Hortic. Bras**, v. 27, n. 2, 2009.

MORENA. C. B; KIHARA. H. A; PASCHON. V. A prática de meditação pode aliviar déficits cognitivos da doença de Alzheimer. v. 3, n. 7, 2016.

NETO, S. J; BEZERRA. M. R. C; FERNANDES. P. N; MEDEIROS. M. R; NOVA. V. M. R. A; PINTO. S. D. a fitoterapia como terapêutica complementar no tratamento do alzheimer. **Rev. Ciênc. Saúde Nova Esperança**. v. 12. 2014.

OLIVEIRA, A.B.J.K., et al. Psicofármacos Paliativos na Doença de Alzheimer **Revista Saúde em Foco**. n. 10, 2018.

PAIVA, Franciny Aparecida. **Baccharis trimera protege contra o estresse oxidativo e toxicidade induzida pelo peptídeo β -amilóide no *Caenorhabditis elegans***. 2015. 85f. Tese de (Doutorado) Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas – Universidade Federal de Ouro Preto, Instituto de Ciências Exatas e Biológicas, Ouro Preto, MG, 2015.

PINTO JUNIOR, R. A., et al. Bioatividade de óleos essenciais de sassafrás e eucalipto em cascudinho. **Ciência Rural**. Santa Maria, v.40, n.3, p.637-643. 2010.

POSTUA, A. P., et al. *Pinus halepensis* essential oil attenuates the toxic Alzheimer's amyloid beta (1-42) -induced memory impairment and oxidative stress in the rat hippocampus. **Biomedicina e Farmacoterapi**. p.112, 2019.

RACZ, I. P., et al. Application of *Caenorhabditis elegans* (nematode) and Danio rerio embryo (zebrafish) as model systems to screen for developmental and reproductive toxicity of Piperazine compounds. **Toxicology in Vitro**. v.44, p.11-16. 2017.

RIBEIRO, M. S; BONILLA. H. O; LUCENA. P. M. E. Influência da sazonalidade e do ciclo circadiano no rendimento e composição química dos óleos essenciais de *Croton* spp. da Caatinga. **Iheringia, Série Botânica**, v. 73(1), p. 31-38, 2018.

RIECKHER, M, A.F.C; LOPES; SHUMACHE, B. Estabilidade do genoma em *Caenorhabditis elegans*. Elsevier, cap 1, p. 165, 2016.

RODRIGUES, Raphael de Oliveira. Estudo do potencial antioxidante, anti-inflamatório e cicatrizante de *bauhinia unguolata* l. Orientadora; Aparecida Tiemi Nagao-Dias. 2019. 138f. Tese de (doutorado) Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Universidade federal do Ceará faculdade de farmácia, odontologia e enfermagem. CE. Fortaleza, 2019.

SANTOS, K.M.; GONÇALVES, P.S.; PAIVA, M.J.N.; LACERDA, G.A. Acetylcholinesterase and Inhibition from Startin extracts of *Bauhinia variegata* L, *Bauhinia* Var. *Candida* (Aiton) Buch – ham and *Bauhinia unguolata* L. **Revista Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 44, 6, p.741-783, 2011.

SANTOS, Vanessa Sardinha dos. "Alzheimer"; *Brasil Escola*. Disponível em: <https://brasilecola.uol.com.br/doencas/alzheimer.htm>. Acesso em 11 de setembro de 2024.

SCHWMBACH. H.K; AMADOR.A.T. Estudo da Utilização de Plantas Medicinais em um Município do Sul do Brasil. **Latim American Journal of Pharmacy**. v.26, n. 4, p.602-8, 2007.

SERENIKI, A; VITAL, F.B.A.M. A Doença de Alzheimer: Aspectos fisiopatológicos e farmacológicos. **Psiquiatria RS**, v.30, n.1 Supl, 2008.

SILVÉRIO, R. M; ESPINDOLA. S. L; LOPES. P. N; VIEIRA. C. P. Plant Natural Products for the Control of *Aedes aegypti*: The Main Vector of Important Arboviruses. **Molecules**, v. 25. p. 3484. 2020.

SOUZA, M. A S., et al. Óleos Essenciais: Aspectos econômicos e sustentáveis. **Enciclopédia biosfera**, Centro Científico Conhecer - Goiânia, p.3, v.6, N.10, 2010.

SOUZA, S. P., et al. Óleos essenciais como inibidores da acetilcolinesterase. **Revista Fitos**, Vol. 7 - nº 04, 2012

TISSENBAUM, H.A. Usando o *C. elegans* para pesquisa de envelhecimento. **Invertebr. Reproduzir**, n.59, p. 59-63, 2015.

TRUSHINA, E; MIELKE. M. M. **Biochim Biophys Acta**. v. 1842, n. 8, p. 1232 – 1239, 2014. UNZENTA, M; ESTEBAN. G; BOLEA. I; FOGEL. A.W; RAMSAY. R; YODIM.BH.M., et

al. Multi-Target Directed Donepezil-Like Ligands for Alzheimer's Disease. **Neurociência Fronta**, v. 10, p.205, 2016.

VAZ, A.M.S.F. 2020. *Bauhinia* in **Flora do Brasil 2020**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<https://floradobrasil2020.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB22831>>. Acesso em: 01 jun. 2022

VIDAL, C; ZHANG.L. An Analysis of the Neurological and Molecular Alterations Underlying the Pathogenesis of Alzheimer's Disease. **Cells**. N.10, p.546, 2021.

VIEGAS Jr. C., et al. Produtos naturais como candidatos a fármacos úteis no tratamento do mal de Alzheimer. **Química Nova**. n.27, p.655, 2004.

VIEIRA, D. G., et al. A deposição do peptídeo beta - amiloide e as alterações vasculares presentes na doença de Alzheimer. **J. Health. Biol. Sci.** v. 2(4), p. 218 – 223, 2014.

VIERO, C. L. A; DOMBROWSKI. A. P. Plantas medicinais e a doença de Alzheimer. **Brazilian Journal of Development**. Curitiba, v. 8, n. 3, p. 16007-16021, 2022.

WIMO, A., et al. The worldwide costs of dementia 2015 and comparisons with 2010 **Alzheimer's & Dementia**. v.13, p.1-7, 2017.

YAN LU., et al. The Essential Oil from *Acori Tatarinowii* Rhizome (the Dried Rhizome of *Acorus tatarinowii* Schott) Prevents Hydrogen Peroxide-Induced Cell Injury in PC12 Cells: A Signaling Triggered by CREB/PGC-1 α . **Activation. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, p.12, 2020.

YUEN, W.C., et al. Danshen (*Salvia miltiorrhiza*) water extract shows potential neuroprotective effects in *Caenorhabditis elegans*. **Journal of Ethnopharmacology**, p.266, 2021.

ZHU, A., et al. Oxidation and Antioxidation of Natural Products in the Model Organism *Caenorhabditis elegans*. **Antioxidants**, v.11, p.705, 2022.

CAPÍTULO 1 - ATIVIDADE ANTIOXIDANTE IN VITRO E IN SILICO E CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Bauhinia unguolata*

1INTRODUÇÃO

Espécies reativas de oxigênio (ROS), como oxigênio singlete (O_2), radical hidroxila (OH^\cdot), ânion superóxido (O^\cdot) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2), bem como espécies reativas de nitrogênio (RNS), incluindo óxido nítrico (NO), dióxido de nitrogênio (NO_2), trióxido de dinitrogênio (N_2O_3), ânion nitroxila (NO^\cdot), cátion nitroxila (NO^+) e peroxinitrito ($ONOO^\cdot$), são produtos de reações biológicas ou fatores exógenos (MARTEMUCCI et al., 2022). A produção desproporcional de ROS/RNS em comparação com as capacidades do sistema antioxidante pode levar a níveis elevados de radicais livres. Estas moléculas prejudiciais podem danificar componentes biológicos cruciais, como ADN, proteínas, lípidos e açúcares, impactando negativamente a saúde das células e dos tecidos, muitas vezes levando a doenças neurodegenerativas e cardiovasculares (YADAV et al., 2023; LI et al., 2023)

É possível que em muitas situações esses danos ainda possam ser reversíveis e prevenidos, principalmente através de mecanismos antioxidantes mecanismos como a ação de antioxidantes naturais como a vitamina C ou por meio de enzimas como a Catalase humana (CATH), responsável pela conversão de H_2O_2 em O_2 e H_2O , a superóxido dismutase (SOD) e a glutathione peroxidase (GPx). O mau funcionamento destas enzimas está frequentemente associado ao desenvolvimento e progressão de doenças crônicas como Alzheimer, Parkinson e AVC (HALLIWELL, 2023; NANDI et al., 2019; MAITI et al., 2021).

Tendo esse pensamento em mente, os produtos e moléculas naturais surgiram nos últimos anos como potenciais protagonistas na prevenção e proteção contra espécies reativas originadas do estresse oxidativo celular, especialmente devido às suas propriedades antioxidantes (MENDONÇA-JUNIOR et al., 2021; KIM et al., 2023). Entre esses produtos naturais, os óleos essenciais têm recebido cada vez mais atenção nos grupos de pesquisa devido à sua baixa toxicidade e natureza hidrofóbica, propriedades que permitem maior biodisponibilidade e melhor absorção em comparação com outros extratos. Muitos deles já estão documentados na literatura como potentes antioxidantes, como a citronela (*Cymbopogon nardus*), canela (*Cinnamomum zeylanicum*), gengibre (*Zingiber officinale*), e manjeriço (*Origanum. majorana*) (ANDRADE et al., 2012; BUKHARI et al., 2022; CAPPELLI et al., 2023; LIMA et al., 2020).

Bauhinia unguolata é uma espécie de planta medicinal encontrada na floresta amazônica brasileira. Comunidades tradicionais, como o povo indígena Tapebas no estado do

Ceará, utilizam o chá da folha de *B. unguolata* por suas propriedades benéficas, como ação hipoglicemiante (BORIM et al., 2023; MORAIS et al., 2005). Estudos revelaram que *B. unguolata* possui propriedades antioxidantes, antimicrobianas, larvicidas, propriedades antiinflamatórias, citotóxicas, antiproliferativas e antiacetilcolinesterásicas, além de efeitos hipoglicêmicos (FORTUNATO; NORES, 2022; RODRIGUES et al., 2020). As plantas do gênero *Bauhinia* apresentam diversos fitoquímicos com atividades antioxidantes descritos na literatura, caracterizados por altos níveis de compostos fenólicos e flavonóides (MONTEIRO et al., 2021; CHÁVEZ-BUSTOS et al., 2022).

Embora os mecanismos por trás da atividade antioxidante desta espécie permaneçam obscuros, os efeitos antioxidantes do óleo essencial de *Bauhinia unguolata* (OEBU) não foram abordados. Com essa premissa, o trabalho visa rastrear os diferentes compostos bioativos em OEBU coletados durante o período chuvoso em Boa Vista, Roraima – Brasil. As propriedades antioxidantes dos principais compostos, bem como as interações entre eles e a enzima antioxidante humana CATH, foram determinadas *in vitro* e *in silico*, respectivamente.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 OBTENÇÃO DE FOLHAS DE *Bauhinia unguolata*

Folhas frescas de *B. unguolata* foram coletadas durante o período chuvoso (julho a setembro) no município de Boa Vista, Roraima, Brasil, com os seguintes georreferenciamentos localizados em 2°51'11.03976 N, 60° N de latitude e 60° 38'26 de longitude W e levado ao laboratório do Programa de Pós-Graduação do NPPGCT na Universidade Federal de Roraima. Um exemplar foi devidamente identificado pela Dra. Amélia Tuler e tombada no Herbário da UFRR, com número 9685 e registrada no SISGEN número A789974.

2.2 EXTRAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL

O material vegetal escolhido foi limpo com água destilada e depois transferido para um frasco de fundo redondo. Em seguida foi submetido à hidrodestilação em aparelho do tipo Clevenger com condensador duplo Spell por 2 horas continuamente para obtenção do OEBU. As folhas frescas foram cortadas em pedaços de cerca de 1 cm⁻¹ e transferidas para um frasco de fundo redondo na proporção de 1000 g e 6 L de água destilada. O frasco foi aquecido em uma manta de aquecimento a 100°C. O hidrolato foi removido do OEBU pela adição de sulfato de sódio anidro e armazenado em freezer a -20 °C (MESQUITA, et al., 2016).

2.3 CROMATOGRAFIA

2.3.1 Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (CG-EM)

A análise foi realizada em um cromatógrafo gasoso GC-MS (QP2010) ULTRA (Shimadzu) equipado com um Rxi-1 ms (30 m 0,25 mm×0,25 µm) Coluna (Restek) em variações de temperatura de 50 °C (3 min), aumentando 3 °C.min⁻¹, até 230 °C. A 1 µL de OEBU a amostra foi diluída a 1% em clorofórmio que também foi injetado com temperatura inicial de 250 °C, juntamente com uma proporção de modo dividido (1:10), interface GC-MS a 250 °C e um MS de ionização eletrônica detector operado com energia de ionização de 70 eV a 250 °C. O gás Hélio foi utilizado como carreador com vazão de 2,0 mL.min⁻¹. Os dados foram adquiridos utilizando o software GC-MS Solution (Shimadzu) de cada OEBU, onde foram analisados e comparados com espectros da coleção de bibliotecas de componentes espectrais (NIST11) do Instituto Nacional de Padrões e Tecnologia (NIST).

2.3.2 Cromatografia gasosa com detector de ionização de chama (CG-DIC)

O Cromatógrafo Gasoso HP 7820 A (Agilent), equipado com coluna capilar medindo 30 m×0,32 mm×0,25 µm (Agilent), foi utilizado para identificar os constituintes do óleo a 50 °C (0 min), 3 °C. min⁻¹. Depois foi até 230 °C. A 1 µL de amostra OEBU diluída a 1% em clorofórmio foi injetada, com temperatura inicial de 250 °C na proporção Split (1:30). O detector DIC, com temperatura de 250 °C e gás de arraste, H₂, a 3 mL.min⁻¹. O software de aquisição de dados foi escolhido: com EZChrom Elite Compact (Agilent). A análise quantitativa foi realizada utilizando áreas padrão dos cromatogramas obtidos por CG-DIC.

2.4 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE IN VITRO DE OEBU

2.4.1 Teste de capacidade antioxidante total (CAT)

Esses ensaios compreendem a redução de Mo (VI) a Mo (V) por polissacarídeos sulfatados, seguida pela formação do complexo fosfato verde/Mo (V) em pH ácido. Uma alíquota de OEBU (1 mg. mL⁻¹) foi adicionada a uma solução reagente composta de ácido sulfúrico (0,6 mg. mL⁻¹), também fosfato de potássio (28 mmol. L⁻¹) e molibdato de amônio (4 mmol. L⁻¹) (COSTA et al., 2010). A solução foi agitada num misturador vortex durante 90 minutos a 100°C. Após resfriamento, a absorbância de cada amostra foi determinada a 695 nm usando um espectrofotômetro. O CAT foi expresso como equivalente de ácido ascórbico.

2.4.2 Reduzindo o teste de potência

OEBU em concentrações de 0,05 a 0,5 mg. mL⁻¹ foram incubadas com tampão fosfato

0,2 mol. L⁻¹ (pH 6,6) e ferricianeto de potássio a 1% (m/v) por 20 minutos a 50 °C. Após o período de incubação, foi adicionado ácido tricloroacético a 10% (m/v) para encerrar as reações, seguido pela adição de cloreto de ferro a 0,1% (m/v). Em seguida, as amostras foram analisadas em espectrofotômetro a 700 nm. O ácido ascórbico foi considerado o padrão para cálculos, e os resultados foram expressos como uma porcentagem do poder redutor em comparação ao ácido ascórbico (PRESA et al., 2018).

2.4.3 Teste de capacidade quelante de íons de ferro (Fe²⁺)

O teste de quelação de ferro foi realizado conforme metodologia de COSTA et al., (2010). A mistura reacional, contendo amostras de FeCl₂ (0,05 mL, 2 mM) e ferrozina (0,2 mL, 5 mM), foi bem agitada e incubada por 10 min em temperatura ambiente. A leitura foi realizada em espectrofotômetro a 562 nm, e o EDTA foi utilizado como padrão. OEBU foram utilizadas em concentrações de 0,5 e 0,1 mg. mL⁻¹. Os resultados foram expressos acordocom a equação 2.

$$\% \text{ de sequestro} = \frac{\text{Absorbância do controle} - \text{Absorbância da amostra}}{\text{Absorbância do controle} - \text{Absorbância do branco}} \times 100 \quad (2)$$

~~Equação (2)~~

2.4.4 Capacidade de eliminação de 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (dpph)

A capacidade da OEBU de eliminar radicais livres foi analisada pelo método de Brand- Williams e colegas de trabalho (BRAND-WILLIAMS; CUVELIER; BERSET, 1995). OEBU a 0,25 mg. mL⁻¹, 0,5 mg. mL⁻¹ e 5 mg. mL⁻¹ foram adicionados a 2,0 mL de 0,1 mmol. L⁻¹ Solução etanólica DPPH. Após 30 min de incubação à temperatura ambiente, a absorbância foi medida a 517 nm. Os resultados foram expressos como porcentagem de eliminação de radicais de acordo com a equação 3.

$$\text{Eliminação de radicais DPPH (\%)} = [1 - (As/A0)] \times 100 \quad (3)$$

2.4.5 Constituição fenólica

A dosagem dos compostos fenólicos OEBU foi determinada pelo método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu (SHEN, 2009). Os experimentos foram realizados à temperatura ambiente no escuro. Os compostos fenólicos reduzem o reagente Folin-Ciocalteu, mudando a cor de amarelo para verde. As amostras foram lidas por espectrofotometria a 765 nm. O ácido gálico foi utilizado como controle positivo.

2.5 ANÁLISE IN SILICO

2.5.1 Ancoragem molecular

Os fitoquímicos em OEBU e Maltol (β -cariofileno e α -bisabolol) foram obtidos no PubChem com os respectivos descritores: α -bisabolol (CID: 1549992), β -cariofileno (CID: 5281515) e maltol (CID: 8369) (KIM et al., 2022). A estrutura tridimensional do CAT humano foi obtida no Protein Data Bank (ID: 1TGU), com resolução de 2,80 Å. Para definir locais de ligação adequados para acoplamento molecular, foi utilizado o software GRASP. Este programa se baseia no aprendizado de máquina para identificar esses locais, avaliando a acessibilidade dos resíduos ao solvente, bem como considerando as características físico-químicas e as interações estabelecidas (SANTANA et al., 2020). Testes de docking molecular foram realizados usando Software Autodock Vina (TROTT; OLSON, 2009). A caixa de grade definida tem tamanho 50x60x50 com espaçamento de 0,375 Å, com centro de massa 40,583, 39,019 e 24,834. As interações moleculares entre ligantes e aminoácidos foram demonstradas e analisadas usando o visualizador BIOVIA Discovery Studio.

2.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os desfechos foram expressos em gráficos como média e desvio padrão. A análise estatística foi realizada pelo Teste T de Student e ANOVA seguido pelo teste de Tukey-Kramer e Bonferroni ($p < 0,05$) usando o software GraphPad Prism 8.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os estudos sobre produtos naturais têm sido impulsionados pela sua ampla gama de propriedades para a saúde e pela base de uso tradicional. Formulações de óleos essenciais podem aumentar a biodisponibilidade de seus componentes antioxidantes, tornando-os um potencial tratamento para doenças que envolvem estresse oxidativo. Nesse sentido, o presente estudo analisou os componentes bioativos da OEBU da Amazônia brasileira, determinando assim sua composição química e atividade antioxidante tanto in vitro quanto in silico.

3.1 DESEMPENHO E COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO OEBU

Após a extração do OEBU por hidrodestilação, foi possível obter o rendimento de óleo através da seguinte equação 1. O OEBU apresentou rendimento de aproximadamente 0,07%.

$$\text{Rendimento} = \frac{\text{massa do óleo obtido (g)}}{\text{Massa do óleo vegetal (g)}} \times 100\% \quad (1)$$

O rendimento da extração do OEBU tem sido superior ao trabalho realizado por

4 CONCLUSÃO

O desenvolvimento de novos medicamentos nesta linha de pesquisa é de extrema importância para a elucidação dos fatores causadores da doença de Alzheimer, bem como para a obtenção de um tratamento ou cura eficaz para esta doença. Nossos estudos realizados na Região Amazônica de Roraima, mostraram que o sesquiterpeno α - Bisabolol , principal componente presente no óleo essencial de *Bauhinia unguolata* (OEBU), pode se tornar um forte candidato a medicamento como inibidor da acetilcolinesterase e pode ser usado no tratamento da doença de Alzheimer. Nesse sentido, são necessários estudos contínuos. Devido à extensa diversidade estrutural dos compostos identificados no OEBU, podemos antecipar que novas descobertas podem e ainda não foram feitas como resultado. O OEBU deve ser avaliada quanto aos seus efeitos de aprimoramento neural. As interações entre o α - Bisabolol e os principais compostos de óleos essenciais com o receptor AChE foram significativas, assim como os parâmetros ADME,(Absorção, Distribuição, Metabolismo, Excreção e Toxicidade) onde dados sobre sua farmacocinética podem contribuir para uma melhor compreensão fisiológica do uso de OEBU. Se a maior integração do OEBU na dieta regular ou a ingestão de suplementos pode estabilizar a função da AChE ainda precisa ser explorada.

REFERÊNCIAS

- VIDAL C, Zhang L. An Analysis of the Neurological and Molecular Alterations Underlying the Pathogenesis of Alzheimer's Disease. **Cells**. V. 10 (3), p.546, 2021.
- ATRI A, The Alzheimer's Disease Clinical Spectrum. **Medical Clinics of North America**. v.103 (2), p. 263-293, 2019.
- WIMO A, SEEHER K, CATALDI R, et al. The worldwide costs of dementia in 2019. **Alzheimer's & Dementia**. V.19, p. 2865-2873, 2023.
- TRUSHINA E, MIELKE M.M. Recent advances in the application of metabolomics to Alzheimer's Disease. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease**, v. 1842 (8), p. 1232-1239, 2014.
- PASSERI E, ELKHOURY K, MORSINK M, et al. Alzheimer's Disease: Treatment Strategies and Their Limitations. **International Journal of Molecular Sciences**. V. 23 (22), p. 13954, 2022.
- MARUCCI G, BUCCIONI M, BEN DD, LAMBERTUCCI C, VOLPINI R, AMENTA F. Efficacy of acetylcholinesterase inhibitors in Alzheimer's disease. **Neuropharmacology** v.190, p. 108352, 2020.
- KHOURY R, RAJAMANICKAM J, GROSSBERG GT. An update on the safety of current therapies for Alzheimer's disease: focus on rivastigmine. **Therapeutic Advances in Drug Safety**. V. 9 (3), p. 171-178, 2018.
- ALI T.B, SCHLERET TR, REILLY BM, CHEN WY, ABAGYAN R. ADVERSE Effects of Cholinesterase Inhibitors in Dementia. According to the Pharmacovigilance Databases of the United-States and Canada. Cavalli A, ed. **Plos one**. V. 10 (12), 2015.
- BAKKALI F, AVERBECK S, AVERBECK D, IDAOMAR M. Biological effects of essential oils – A review. **Food and Chemical Toxicology**. V.46 (2), 446-475, 2008.
- DEYNO S, MTEWA AG, ABEBE A, et al. Essential oils as topical anti-infective agents: A systematic review and metaanalysis. **Complementary Therapies in Medicine** v. 47, p. 102224, 2019.
- VALDIVIESO-UGARTE M, GOMEZ-LLORENTE C, PLAZA-DÍAZ J, GIL Á. Antimicrobial, Antioxidant, and Immunomodulatory Properties of Essential Oils: A Systematic Review. **Nutrients**. V. 11 (11), p. 2786, 2019.
- MIGUEL. M.G. Antioxidant and Anti-Inflammatory Activities of Essential Oils: A Short Review. **Molecules**. v. 15 (12), p. 9252-9287, 2010.
- FRIEDLI M.J, INESTROSA N.C. HUPERZINE A and Its Neuroprotective Molecular Signaling in Alzheimer's Disease. **Molecules**. v. 26 (21), p. 6531, 2021.
- TANG J.J, HUANG L.F, DENG J.L, et al. Cognitive enhancement and neuroprotective effects of OABL, a sesquiterpene lactone in 5xFAD Alzheimer's disease mice model. **Redox Biology**. v. 50, p. 102229, 2022.

- MARTINS. R.M.G, XAVIER-JÚNIOR F.H, BARROS MR, et al. Impact on cholinesterase-inhibition and in silico investigations of sesquiterpenoids from Amazonian *Siparuna guianensis* Aubl. ***Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*** v. **252**, p. 119511, 2021.
- FORTUNATO R.H, NORES M.J. “Cow’s Hoof” (*Bauhinia* L., Leguminosae): A Review on Pharmacological Properties of Austral South American Species. ***Plants*** v.12 (1), p. 31-31, 2022.
- FILHO V.C. Chemical composition and biological potential of plants from the genus *Bauhinia*. ***Phytotherapy Research***. V. 23 (10), p. 1347-1354, 2009.
- SOUSA L.M, CARVALHO J.L, DA SILVA H.C, LEMOS TLG, et al. New Cytotoxic Bibenzyl and Other Constituents from *Bauhinia unguulate* L. (Fabaceae). ***Chemistry & Biodiversity***. V. 13 (12), p.1630-1635, 2016.
- BORIM. A.J.S, OCAMPOS F.M.M, CATOIA P. R, et al. NMR-Based Metabolomics Reveals Effects of Water Stress in the Primary and Specialized Metabolisms of *Bauhinia unguata* L. (Fabaceae). ***Metabolites***. V. (3), p.381, 2023.
- KAURINOVIC B, VASTAG D. Flavonoids and Phenolic Acids as Potential Natural Antioxidants. in Antioxidants, ***IntechOpen***, p.167-169, 2019.
- SANTOS, K.M, GONÇALVES PS, PAIVA M.J.N DE, LACERDA GA. Acetylcholinesterase inhibition starting from extracts of *Bauhinia variegata* L., *Bauhinia* var. *candida* (Aiton) Buch.- Ham., and *Bauhinia unguata* L. ***Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical***. v. 44 (6), p. 781-783, 2011.
- MEDEIROS, S.R.N.A, MELO FILHO A.A, COSTA H.N.R da, et al. Chemical profile, antimicrobial activity, toxicity on *Artemia salina* and anti-acetylcholinesterase enzyme essential oil from *Bauhinia unguata* L. (Fabaceae) leaves. ***Journal of Medicinal Plants Research***. V. 10 (29), p. 442-449, 2016.
- SILVA A.M.A, SILVA HC, MONTEIRO A.O, et al. Chemical composition, larvicidal and cytotoxic activities of the leaf essential oil of *Bauhinia cheilantha* (Bong.) Steud. ***South African Journal of Botany*** v. 131, p.369-373, 2020
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. ***Analytical Biochemistry***. V. 72 (1-2): 248-254, 1976.
- SEDMAK J.J, GROSSBERG S.E. A rapid, sensitive, and versatile assay for protein using Coomassie brilliant blue G250. ***Analytical Biochemistry*** v. 79 (1), p. 544-552, 1977.
- KIM S, CHEN J, CHENG T, et al. PubChem 2023 update. ***Nucleic Acids Research*** v.51(D1), 2022.
- CHEUNG J, RUDOLPH M.J, BURSHTEYN F, et al. Structures of Human Acetylcholinesterase in Complex with Pharmacologically Important Ligands. ***Journal of Medicinal Chemistry***. V. 55 (22), p. 10282-10286, 2012.

WATERHOUSE A, BERTONI M, BIENERT S, et al. SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. **Nucleic Acids Research** . v.46 (W1), p.296-303, 2018.

NACHON F, CARLETTI E, RONCO C, et al. Crystal structures of human cholinesterases in complex with huprine W and tacrine: elements of specificity for anti-Alzheimer's drugs targeting acetyl- and butyryl-cholinesterase. **The Biochemical Journal**. V. 453 (3), p. 393-399, 2013.

SANTANA C.A, SILVEIRA S.A, MORAES J.P.A, et al. GRaSP: a graph-based residue neighborhood strategy to predict binding sites. **Bioinformatics (Oxford, England)** v.36 (Suppl_2) p. i726-i734, 2020.

FURQAN T, BATOOL S, HABIB R, et al. Cannabis Constituents and Acetylcholinesterase Interaction: Molecular Docking In Vitro Studies and Association with CNR1 rs806368 and AChE rs17228602. **Biomolecules** v. 10 (5), p. 758, 2020.

TROTT O, OLSON AJ. AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. **Journal of Computational Chemistry**. v. 31 (2), 2009.

DAINA A, MICHELIN O, ZOETE V. SwissADME: a Free web Tool to Evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and Medicinal Chemistry Friendliness of Small Molecules. **Scientific Reports** v. 7 (1), 2017.

DAINA A, MICHELIN O, ZOETE V. SwissTargetPrediction: updated data and new features for efficient prediction of protein targets of small molecules. **Nucleic Acids Research**. v. 47 (W1): p.357-364, 2019.

PATHAN M, KEERTHIKUMAR S, ANG C.S, et al. FunRich: An open access standalone functional enrichment and interaction network analysis tool. **Proteomics**. v. 15 (15). p. 2597-2601, 2015.

GE SX, JUNG D, YAO R. SHINYGO: a graphical gene-set enrichment tool for animals and plants. Valencia A, ed. **Bioinformatics**. V. 36 (8): 2628-2629, 2019.

MOTA W.M, BARROS M.L, CUNHA P.E.L, et al. Avaliação da inibição da acetilcolinesterase por extratos de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. V. 14 (4), p. 624-628, 2012.

SHANMUGANATHAN B, SURYANARAYANAN V, SATHYA S, et al. Anti-amyloidogenic and anti-apoptotic effect of α -bisabolol against A β induced neurotoxicity in PC12 cells. **European Journal of Medicinal Chemistry**. V. 143, p. 1196-1207, 2018.

EDDIN L.B, JHA N.K, GOYAL S.N, et al. Health Benefits, Pharmacological Effects, Molecular Mechanisms, and Therapeutic Potential of α -Bisabolol. **Nutrients**. V. 14 (7), p. 1370, 2022.

WU F, Zhou Y, Li L, et al. Computational Approaches in Preclinical Studies on Drug Discovery and Development. **Frontiers in Chemistry**. V. 8, 2020.

SRIVALLI K.M.R, LAKSHMI P.K. Overview of P-glycoprotein inhibitors: a rational outlook. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**. V. 48 (3), p. 353-367, 2012.

MARTIN YC, A Bioavailability Score. **Journal of Medicinal Chemistry**. V. (9), p. 3164-3170, 2005.

EGAN W.J, Merz, K.M, BALDWIN J.J. Prediction of Drug Absorption Using Multivariate Statistics. **Journal of Medicinal Chemistry** 43 (21): 3867-3877, 2000.

ASHBURNER M, Ball CA, Blake JA, et al. Gene Ontology: tool for the unification of biology. **Nature Genetics**. v. 25 (1), p. 25-29, (2000).

HENRIQUES A.G, MÜLLER T, OLIVEIRA J.M., et al. Altered protein phosphorylation as a resource for potential AD biomarkers. **Scientific Reports**, v. 6 (1), p.30319, 2016.

FERRER I, POL ANDRÉS-BENITO, AUSÍN K, et al. Dysregulated protein phosphorylation: A determining condition in the continuum of brain aging and Alzheimer's disease. **Brain Pathology**. V. 31 (6), 2021.

YANG. M, Lv Y, TIAN X, E.T al. Neuroprotective Effect of β -Caryophyllene on Cerebral Ischemia-Reperfusion Injury via Regulation of Necroptotic Neuronal Death and Inflammation: In Vivo and in Vitro. **Frontiers in Neuroscience**. v. 11, 2017.

UDDIN M.D.S, KABIR M.D.T, JALOULI M, et al. Neuroinflammatory Signaling in the Pathogenesis of Alzheimer's Disease. **Current Neuropharmacology**. V. 20(1), p. 126-146, 2022.

ROCHA N.F.M, RIOS ERV, CARVALHO AMR, et al. Anti-nociceptive and anti-inflammatory activities of (-)- α -bisabolol in rodents. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* v. 384 (6): 525-533, 2011.

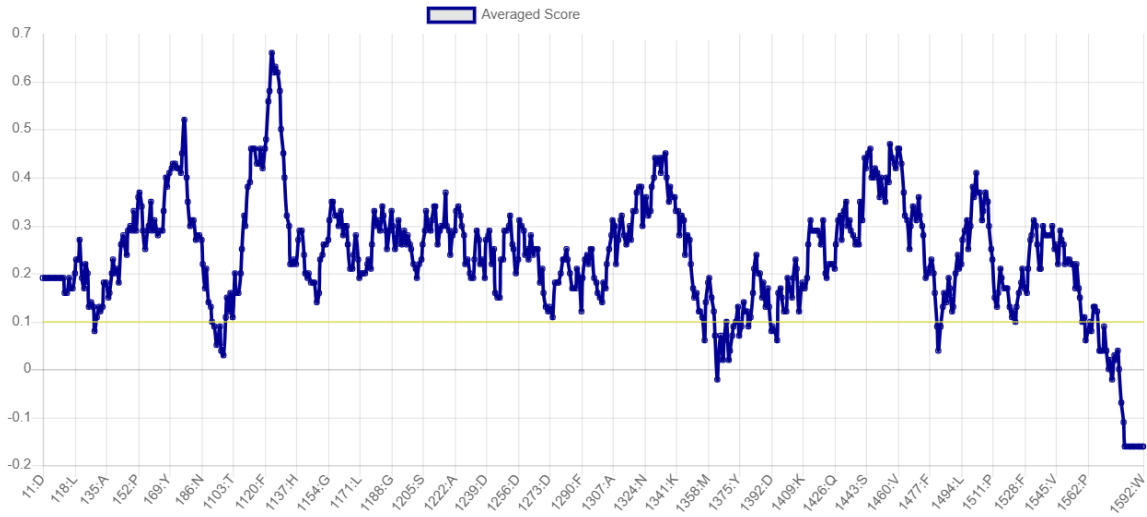
RAMAZANI E, AKABERI M, EMAMI S.A, TAYARANI-NAJARAN Z. Pharmacological and biological effects of alphabisabolol: An updated review of the molecular mechanisms. **Life Sciences**. V. 304, p.120728, 2022.

ALIFRAGIS P, MARSH J. Synaptic dysfunction in Alzheimer's disease: the effects of amyloid beta on synaptic vesicle dynamics as a novel target for therapeutic intervention. **Neural Regeneration Research**. V. 13 (4): 616, 2018.

1 Material Suplementar:

1.1 Figuras suplementares:

Figura S1 . Análise de validação do Verify3D. 90,54% do *Electrophorus electricus*



Fonte autor: Análise de validação do Verify3D. 90,54% do *Electrophorus electricus* Os resíduos de AChE têm uma pontuação média 3D-1D $\geq 0,1$ e o Verify3D recomenda que a estrutura tenha pelo menos 80%.

1.2 Tabelas Suplementares

Tabela S1 . AChE Humana resultados de reenquadramento.

Molécula	Pontuação OURO	RMS (Å)
Aromadendreno	52,15	0,162
Canfeno	40,60	1.745
Óxido de Cariofileno	54,44	0,606
Copaene	53,84	0,331
Cubenol	62,64	0,252
Epi - γ - eudesmol	59,33	0,904
Eucaliptol	40,53	1.536
Farnesol	75,42	0,604
Linalol	50,60	1.885
Nerolidol	73,72	1.750
Espatulenol	56,74	0,506
Valenceno	57,65	0,393
α – Bisabolol	64,15	0,827
α -Bisabolol Óxide A	57,57	0,661
α Bisabolol Óxido B	61,51	0,575
α – Cadineno	60.08	0,381
α – humuleno	52,23	0,252
α – Pineno	39,73	0,486
α – Tujeno	45,59	1.356
β – Cariofileno	50,93	0,369
β – Elemeno	58,48	0,334
β – Pineno	39,62	0,439
γ – Elemeno	51,96	0,450

γ – Muuroleno	57,76	0,698
δ – Cadineno	61,31	0,523
Donepezil ^a	102,83	0,565
Galantamina ^a	71,33	0,807
Huperzina A ^a	53,41	0,263
Neostigmínea ^a	64,34	1,558
Fisostigmina ^a	63,73	0,419
Piridostigmina ^a	46,42	1,685
Rivastigmina ^a	56,48	1,045
Tacrina ^a	58,29	0,979

^a Medicamentos inibidores da acetilcolinesterase aprovados pelo FDA.

Tabela S2 . *E. elétrico*s resultados de reenquadramento .

Molécula	Pontuação OURO	RMS (Å)
Aromadendreno	57.03	0,200
Canfeno	40,76	0,363
Óxido de Cariofileno	54.04	0,183
Copaene	56,90	0,249
Cubenol	63.12	0,330
Epi - γ - eudesmol	41,61	0,520
Eucaliptol	41.17	0,179
Farnesol	67.03	1.805
Linalol	52,97	1.817
Nerolidol	68,55	0,859
Espatuleno	59,32	0,412
Valenceno	60,15	0,519
α – Bisabolol	66,67	0,656
α – Bisabolol Óxido A	57,95	1.938
α – Bisabolol Óxido B	68,44	0,429
α – Cadineno	61,88	0,715
α – humuleno	49,37	0,251
α – Pineno	36h30	1.909-
α – Tujeno	45,92	0,547
β – Cariofileno	50.18	0,174
β – Elemeno	62,83	0,384
β – Pineno	38,48	0,305
γ – Elemeno	58.01	0,796
γ – Muuroleno	57.06	0,185

δ – Cadineno	64,87	0,408
Donepezil ^a	54,69	1.245-
Galantamina ^a	58,34	0,346
Huperzina A ^a	65,79	0,237
Neostigmina ^a	59,84	0,866
Fisostigmina ^a	51,23	0,798
Piridostigmina ^a	52,98	1.782
Rivastigmina ^a	56,79	1.669
Tacrina ^a	66,38	0,264

^a Medicamentos inibidores da acetilcolinesterase aprovados pelo FDA.

CAPÍTULO 3 - ATIVIDADE BIOLÓGICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Bauhinia unguolata* EM NANOEMULSÃO UTILIZANDO O MODELO IN VIVO *Caenorhabditis elegans*

1 INTRODUÇÃO

A experimentação *in vivo* em organismos como modelos de mecanismos humanos é complexa, podendo consumir tempo e ser economicamente inviável. Desta forma, o modelo *in vivo* utilizando o nematódeo *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) vem sendo frequentemente utilizado e destaca-se por proporcionar mecanismos semelhantes aos humanos, podendo ser utilizado como modelo para estudo de inúmeras doenças, inclusive as de ordem neurodegenerativa (ALEXANDER *et al.*, 2014).

O *C. elegans* é um nematódeo minúsculo, multicelular medindo aproximadamente no estágio adulto 1 mm de comprimento e sua larva recém-nascida 0,25 mm (CORSI; WIGHTMAN; CHALFIE, 2015). É um organismo muito bem compreendido a nível de desenvolvimento celular, tem um sistema nervoso muito simples que compreende 302 neurônios e 56 glias, possui corpo transparente que possibilita visualizar mudanças que ocorrem no interior de suas células e corpo, além disso foi o primeiro organismo multicelular que teve seu genoma sequenciado e células neurais descritas apresentando o mapeamento total de todas as interações e neurotransmissores (KAIT, 2021). Está distribuído por todas as partes do globo terrestre e vive no solo ou em frutas podres alimentando-se de bactérias (FERRARI *et al.*, 2015). No laboratório, são tradicionalmente cultivados em *Escherichia coli* OP50 (*E. coli* OP50) como alimento, com uma dieta de aproximadamente 55% de proteína (GAVA, 2014; DIMINOV; MORRIS, 2019). O seu ciclo de vida é curto, pois se desenvolve de ovo a adulto em média em 3 dias em perfeitas condições e é apto a produzir grande quantidade de ovos geneticamente idênticos em virtude devido ao seu dimorfismo sexual ser hegemonicamente hermafrodita. É um organismo não patogênico e sua vida útil é em média de 15 a 22 dias a 25 °C (HALL; ATUM, 2006; TISSENBAUM, 2012). Esse modelo de organismo possui a vantagem de ser um animal simples, com um sistema nervoso, reprodutor e digestivo presentes em um pequeno verme e tem sido muito utilizado em uma gama de investigações, tais como atividade nematicida, estudo de sistema funcional de parasitas (GAVA, 2014), modelos para as doenças como Huntington e Alzheimer (BOASQUÍVIS *et al.*, 2018; ALMEIDA *et al.*, 2018; MENG *et al.*, 2017; LEITE, 2018; SOUZA *et al.*, 2012; VIEIRA *et al.*, 2014; PAIVA *et al.*, 2015), modelos de mecanismos de estresse oxidativo

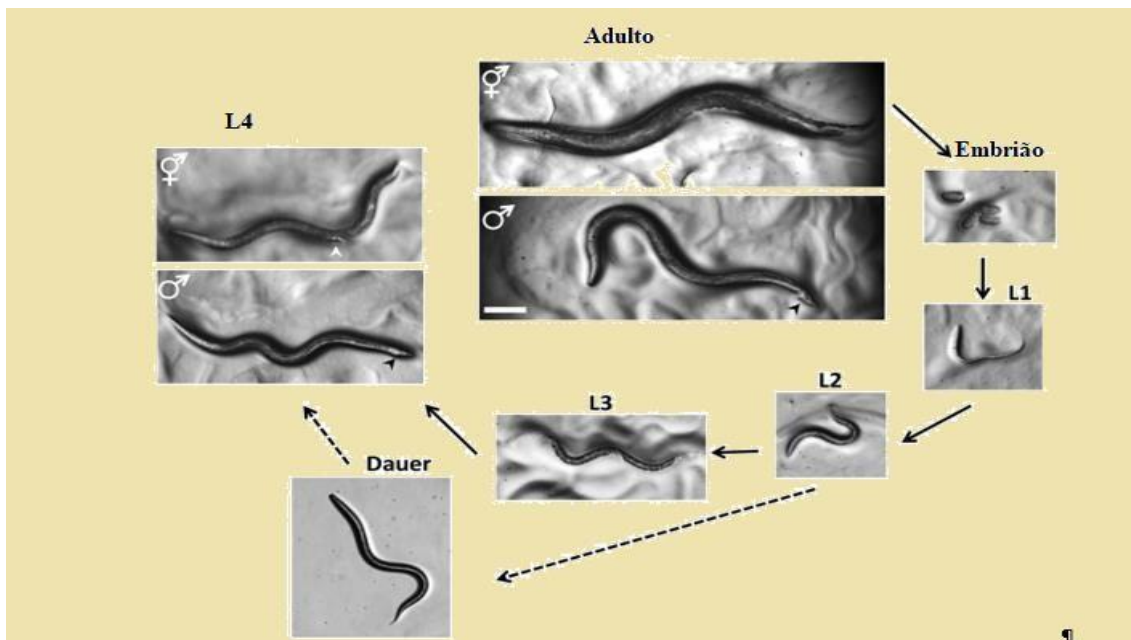
(BONOMO, 2014), triagem de drogas quanto a eficácia e toxicidade (CHARÃO, 2015; RACZ *et al.*, 2017; SOUZA *et al.*, 2018). Diante do exposto, este capítulo tem como objetivo estudar o potencial antiacetilcolinesterásico do óleo essencial de *B. unguolata* no modelo *Caenorhabditis Elegans* como alternativa para o tratamento da doença do Alzheimer.

1.1 *Caenorhabditis elegans* COMO FERRAMENTA DE ESTUDO NA DOENÇA DE ALZHEIMER

Embora o *C. elegans* seja muito diferente dos humanos, possui um sistema nervoso altamente conservado, construído por um terço das células humanas. Isso o torna uma ferramenta de investigação a respostas antioxidantes induzidas por produtos naturais no sistema nervoso, incluindo processos de neuroinflamação, tais como a doença de Alzheimer, Parkinson, entre outras. A neurotoxicidade dos vermes pode ser monitorada de acordo com parâmetros comportamentais, como locomoção e capacidade de forrageamento, parâmetros morfológicos e fisiológicos, como estrutura neuronal, neurodegeneração e neuroinflamação, parâmetros moleculares, como atividade da acetilcolinesterase, expressão gênica relativa e estresse oxidativo. (ZHU *et al.*, 2022). Muitas cepas transgênicas de *C. elegans* tem sido estudo dos efeitos de produtos naturais com ênfase na toxicidade da amiloide- β ($A\beta$) (FONTE *et al.*, 2011, PANDEY *et al.*, 2020, YUEN *et al.*, 2021).

Durante o seu desenvolvimento o nematoide hermafrodita passa por quatro estágios larvais L1, L2, L3 e L4 até chegar à fase adulta, porém em condições em que haja desequilíbrio no ambiente, como falta de alimento este pode dar uma pausa em seu desenvolvimento entrando em estado de larva Dauer, porém, ao restabelecer essas condições, podem progredir com o ciclo normalmente, Figura. 1.

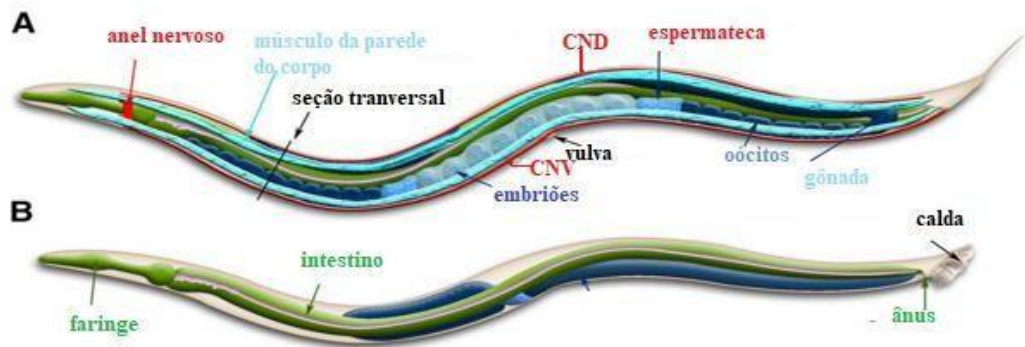
Figura 1. Ciclo de vida do nematódeo *C. elegans* á 20 °C.



Fonte: adaptado de Wormbook (CORSI et al., 2015). O verme hermafrodita grávido expela os ovos e após eclosão, passa por quatro estágios larvais (L1, L2, L3 e L4) até chegar à fase adulta. Em condições ambientais desfavoráveis ao seu desenvolvimento, como ausência de alimento, os vermes em L1 pode tornar-se larvas *Dauer*.

O sistema digestivo do *C. elegans* compreende uma faringe simples (esôfago), intestino e intestino posterior (reto). O intestino é um tubo simples composto por 20 células que percorre cerca de 80% do comprimento do animal, Fig. 2, além de servir como o principal local de digestão e absorção de nutrientes, o intestino também exerce as funções do fígado, além de ter papéis centrais na infecção por patógenos, imunidade, longevidade e desintoxicação de metais (DIMINOV; MORRIS, 2019).

Figura 2. Principais características da anatomia do nematoide *C. elegans*.



Fonte: Adaptado de: Wormbook (CORSI et al., 2015). (A) visão lateral do verme, mostra o cordão nervoso dorsal (CND) e o cordão nervoso ventral (CNV), que se estende ao longo de todo o comprimento do animal a partir do anel nervoso e localização da parede dos músculos, espermateca, embriões, ovócitos, gônadas e vulva, (B) O sistema nervoso e os músculos são omitidos nesta visão, revelando a faringe, o intestino e o ânus.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 REAGENTES QUÍMICOS

Polissorbato 80 (Synth, 99,9%), dimetilsulfóxido (Synth, 99,9%), reagente de Bradford (Sigma-Aldrich), 5,5'-Ditiobis (ácido 2-nitrobenzóico) (Sigma-Aldrich), iodeto de acetiltiocolina ($\geq 98\%$) (Sigma-Aldrich). Todos os reagentes eram de grau analítico e utilizados sem purificação adicional.

2.2 ÓLEO ESSENCIAL DE *Bauhinia unguolata*

As folhas frescas de *Bauhinia unguolata* foram coletadas no período chuvoso (julho a setembro), entre 7h e 9h e georreferenciadas para análise fenológica no local 2° 51'11.03976 N 60° 38'23.63172 W no município de Boa Vista, no estado de Roraima, Brasil. Aproximadamente 1000 g de folhas recém-cortadas (1cm^{-1}) foram adicionadas a um aparelho Clevenger com 6 L de água destilada. O óleo essencial foi obtido por hidrodestilação por um período de 2 h sob aquecimento ($100 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$). A água foi retirada pela adição de sulfato de sódio anidro e posteriormente o óleo essencial foi armazenado em freezer a $-20 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$.

2.3 PREPARAÇÃO DAS FORMULAÇÕES CONTENDO O ÓLEO ESSENCIAL DE *B. unguolata*

Emulsões óleo em água foram produzidas pelo método de alta energia nas concentrações de 0,75, 0,25, 0,025 e 0,0125 mg. mL^{-1} e nanoemulsões nas concentrações de 0,75 e 0,25 mg. mL^{-1} . Polissorbato 80 (Tween 80) a 1% foi utilizado para as nanoemulsões e o dimetilsulfóxido (DMSO) 2% para a construção das emulsões. Os solventes foram adicionados à fase oleosa sob agitação e em seguida foi adicionada água deionizada tipo 2 (MiliQ®) para produzir a formulação primária. A homogeneização da emulsão foi obtida por meio de forças de cisalhamento geradas pelo ultrassonicador (Eco-sonics, São Paulo, Brasil). As emulsões foram sonicadas por 30s a 50% de potência, enquanto as nanoemulsões foram sonicadas por 5 e 10 min. As formulações finais foram utilizadas para testes de estabilidade físico-química e as melhores formulações foram selecionadas para as análises in vivo.

2.3.2 Tamanho de partícula, potencial Zeta e índice de polidispersidade da nanoemulsão

Uma amostra da nanoemulsão foi diluída em água ultrapura tipo 2 (MiliQ®) na proporção de 1:9. Em seguida, o sistema foi equilibrado por 20 s a $22 \text{ }^\circ\text{C}$ e então o tamanho das gotas e o índice de polidispersidade (PDI) foram determinados utilizando o equipamento Zetasizer (Malvern Nano ZS, Malvern, UK). O potencial Zeta foi analisado diluindo $50 \mu\text{L}$ da

nanoemulsão em 950 µL de solução de NaCl 0,6 mg/mL⁻¹. O sistema foi equilibrado por 20 s a 22 °C. Todas as análises foram realizadas em triplicata e representadas como média (±DP) (GOH et al., 2021).

2.3.3 Ciclo de resfriamento de aquecimento da nanoemulsão

A formulação preparada foi caracterizada pelo ciclo resfriamento-aquecimento para avaliar a estabilidade termodinâmica das nanoemulsões. A amostra foi armazenada a 4°C por 24 horas e mantida a 48°C por 24 horas. O ciclo de aquecimento-resfriamento foi repetido três vezes consecutivas. (ULLAH et al., 2022).

2.3.4 Ciclo de congelamento-descongelamento da nanoemulsão

As nanoemulsões foram congeladas a -20 °C por 24 h, após serem removidas e descongeladas em temperatura ambiente. O ciclo de congelamento-descongelamento foi repetido três vezes e depois submetido à centrifugação para observar a separação de fases (RASHAD et al., 2020).

2.3.5 pH da nanoemulsão

O pH das nanoemulsões foi medido com pHmetro previamente calibrado em temperatura ambiente (20 ± 2 °C). As nanoformulações foram investigadas sem diluições e diretamente após o processo de formulação (HE et al., 2021).

2.3.6 Estabilidade macroscópica da nanoemulsão

A estabilidade das nanoemulsões foi avaliada pelo método de HE et al. (2021). As formulações foram submetidas à centrifugação para verificar a cinética de estabilidade. As formulações foram centrifugadas a 1.000, 2.000 e 3.000 rpm por 15 min. Em seguida, foi determinada uma característica macroscópica comparando as formulações antes e depois do ciclo de centrifugação.

2.3.7 Fotomicrografia da nanoemulsão

A morfologia e dispersão das nanoemulsões foram investigadas por microscopia óptica utilizando um Carl Zeiss Imager.M2m (Carl Zeiss Light Microscopy, Göttinger, Alemanha). As amostras foram preparadas colocando as nanoemulsões diretamente em lâminas de vidro (SOUZA et al., 2014).

2.4 ATIVIDADE BIOLÓGICA DAS FORMULAÇÕES com *Bauhinia unguolata* em *C. elegans*

Para a realização das análises in vivo, os experimentos seguiram os protocolos e literatura estabelecidos pelo laboratório de neuroimunogenética, localizado no Instituto Keizo Asami (iLIKA) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), sob a direção da professora Doutora Priscila Gubert.

2.4.2 Estirpes e Cultura de *C. elegans*

Todas as cepas são derivadas da cepa N2 Bristol. A cepa transgênica CL2006 (dvIs2 [*pCL12* (*unc-54/peptídeo Abeta humano 1-42 minigene*) + *rol-6* (*su1006*)]), foi obtida do Caenorhabditis Genetic Center (CGC, Universidade de Minnesota, EUA), sendo esta gentilmente cedida pela professora Dr^a Riva de Paula responsável pelo Laboratório de Bioquímica e Genética da Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Os animais utilizados nos experimentos foram cultivados em placas de Petri de (60 mm) com (Meio de Crescimento para Nematódeo (NGM: 3 g L⁻¹ NaCl; 17 g L⁻¹ ágar; 2,5 g L⁻¹ peptona; 1 M CaCl²; 5 mg L⁻¹ colesterol; 1 M MgSO₄) e a bactéria *E. coli* (OP50), como fonte de alimento (BRENNER 1974). A cepa selvagem N2 foi mantida a 20 °C ± 2 e a cepa transgênica CL 2006 que expressa o peptídeo β amiloide nos músculos do verme, a 15 °C ± 2 até o momento dos experimentos. Todos os ensaios foram realizados usando animais hermafroditas.

A população sincronizada de vermes foi obtida pelo método do hipoclorito alcalino (branqueamento) em vermes adultos prenhes (STIERNAGLE 2006). Aproximadamente doze horas após a sincronização, os animais L1 foram expostos ao tratamento.

2.4.3 Sincronização dos nematódeos

Para cada experimento os nematoides foram sincronizados por meio de lise alcalina, com o objetivo de deixar todos no mesmo estado larval.

A lise alcalina consistiu no tratamento de animais hermafroditas adultos grávidos com solução de lise composta por 1000 µL de hipoclorito de sódio a 2% mais 250 µL de NaOH 10 mol. L⁻¹, por até no máximo 8 minutos sob agitação constante para quebrar a cutícula do verme. Os ovos, resistentes a esse processo, foram centrifugados e ressuspendidos em meio líquido com M9 por três vezes para evitar que a solução de lise continue ativa, após esse processo os ovos foram colocados em placas de petri de 60 mm, os quais foram mantidos na BOD sob agitação em homogeneizador durante a noite, na temperatura de 20 °C e na ausência de alimento. Após a eclosão dos ovos, os animais permaneceram no estágio larval L1 devido à ausência de alimento até o início dos experimentos.

2.4.4 Preparo de placas de petri com meio de cultura (NGM) para rescimento de nematóides

Para o preparo de uma solução de 200 mL de meio NGM, foram pesados 3,4 g de Bacto Agar, 0,5g de Bacto Peptona, 0,6g de NaCl e diluídos em água destilada até completar 200 mL em frasco de reagente graduado. Posteriormente esta solução foi autoclavada e a ela foi pipetado 5 mL de tampão KPO_4 (1 mol. L^{-1}), 200 μL de CaCl_2 (1 mol. L^{-1}), 200 μL de MgSO_4 (1 mol. L^{-1}), 200 μL de Colesterol (5 mg. mL^{-1} em 95% de EtOH), e 200 μL da solução de

Estreptomicina (200 g.L^{-1}), em cabine de fluxo laminar. Todos os materiais e reagentes utilizados no processo, com exceção da estreptomicina e do colesterol, foram esterilizados em luz UV antes do procedimento. Ao término do preparo da solução de meio NGM, esta foi vertida nas placas de Petri, conforme quantidade adequada para cada experimento, em seguida após secagem do meio, foi pipetado o caldo Luria Broth (LB) contendo a bactéria *E. coli* - (OP50) viva, e deixadas no fluxo até estarem completamente secas. Após secagem das bactérias, as placas foram incubadas em estufa à 37 °C, overnight (CALDICOTT; LARSEN; RIDDLE, 1994). Para a exposição do óleo essencial de *Bauhinia unguolata* e manutenção dos animais foi considerado o tamanho de placas de Petri para cada experimento, respeitando a quantidade adequada para cada tamanho de placa utilizada, sempre se preocupando em adicionar 15% a mais de meio NGM, devido a evaporação dos reagentes.

2.4.5 Exposição crônica à emulsão e nanoemulsão

Vermes no primeiro estágio larval (L1) foram expostos a tratamentos em diferentes concentrações de emulsão e nanoemulsão. Como controles, foram considerados os grupos tampão M9 e DMSO 0,1% (concentração final em placas) para as emulsões, enquanto para as nanoemulsões foram considerados os grupos tampão M9 e Tween 80 0,05% (concentração final nas placas). As placas NGM foram semeadas com *E. coli* OP50 inativada (radiação UV por 15 min) e então as formulações foram adicionadas ao meio de cultura. Os vermes em estágio larval L1 foram transferidos diretamente para a superfície do meio NGM e tratados até 72 horas a 20 °C (HUANG et al., 2021). Ao final das exposições, os vermes foram analisados.

2.4.6 Análise de sobrevivência

Os vermes foram expostos à emulsão e nanoemulsão e a sobrevivência foi avaliada pelas próximas 72 horas. Os vermes foram contados (n = 30) e classificados como vivos ou

mortos com base na presença ou ausência de movimento corporal, resposta ao toque ou bombeamento faríngeo. Todos os grupos foram analisados em três experimentos independentes em triplicata (HUANG *et al.*, 2021).

2.4.7 Análise comportamental: comportamento alimentar, ritmo de defecação e movimento

Após 44 h de tratamento com a emulsão e nanoemulsão até o estágio larval L4 (dia 3) para avaliações comportamentais. Tais observações foram estabelecidas na fase larval L4 devido esta fase preceder a idade adulta, o que pode impactar estes comportamentos pela presença de ovos e progênes no prato. As taxas de alimentação foram medidas considerando a frequência da bomba faríngea do verme no protocolo anterior (WANG, 2008). Resumidamente, as segundas contrações do bulbo da faringe foram contadas manualmente nos vermes em estágio larval L4 na comida durante 10 s e normalizadas para contrações/min, em triplicatas. Foram observados dez vermes de cada condição de tratamento. O tempo entre as defecações foi utilizado como parâmetro de toxicidade. O intervalo entre as contrações intestinais, que representa uma medida indireta do tráfego intestinal, foi registrado três vezes em seis vermes em bactérias de cada grupo (WANG, 2008). A avaliação do movimento consistiu na contagem do número de movimentos de cabeça. Os vermes L4 foram transferidos para uma placa NGM (60 mm) sem bactérias e com 3 mL de tampão M9 e deixados por 1 min para aclimatação. O número de movimentos de cabeça de cada verme durante 20 s foi contado e os valores de 10 vermes foram calculados. A média da contagem foi normalizada para um minuto para análise estatística. Três experimentos independentes foram conduzidos. A análise estatística foi realizada utilizando o software GraphPad Prism 8.0.1 (GraphPad Software, Boston, Estados Unidos). A significância estatística foi fixada em $p < 0,05$, utilizando Anova One-way, seguida do teste de Bonferroni (YAMASAKI *et al.*, 2021).

2.4.8 Análise de reprodução

A produção de ovos foi realizada por meio de testes previamente estabelecidos na literatura (GUBERT *et al.*, 2013). Foram utilizados animais grávidos (dia adulto 1, 72 h após o tratamento). O número de ovos no útero dos vermes foi determinado por contagem após cada animal ter sido lisado com a solução branqueadora. Os testes foram realizados com 10 animais por grupo a $20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$ em triplicado.

2.4.9 Análise do comprimento corporal

O comprimento corporal de *C. elegans* foi avaliado 44 horas após exposição à emulsão

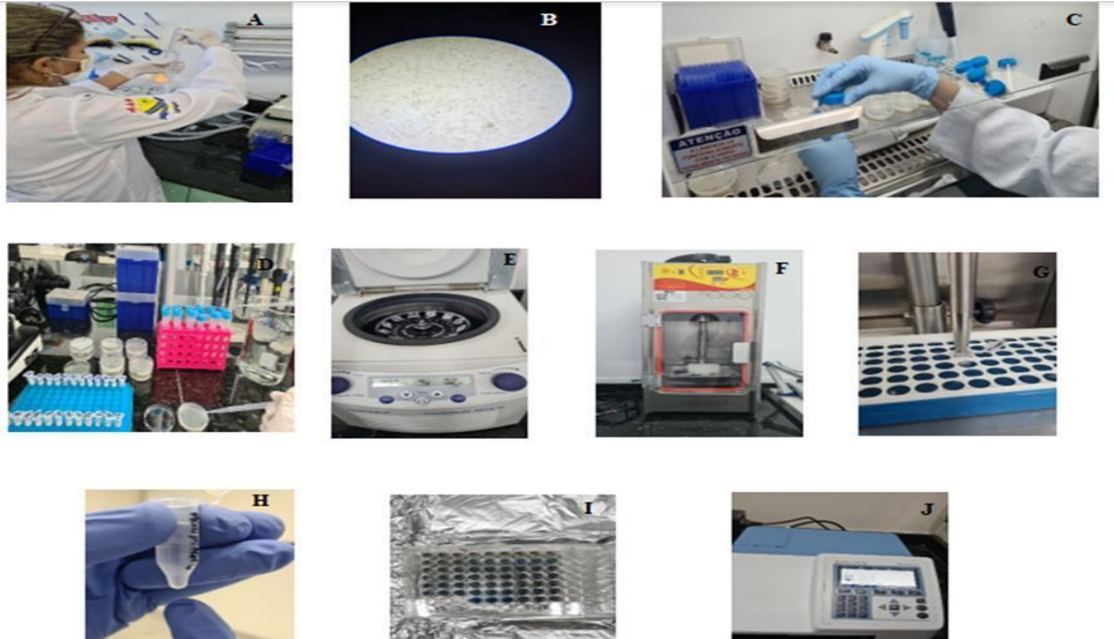
e nanoemulsão. Os vermes foram colocados em uma lâmina de vidro de agarose a 2% e, em seguida, foi adicionada azida de sódio 1 M para paralisar os animais. As imagens microscópicas foram obtidas pelo Carl Zeiss Microscope GmbH (Axio Imager M2m) acoplado à câmera AxioCam HRc (Zeiss, Oberkochen, Alemanha). O comprimento corporal foi medido usando o software de código aberto ImageJ. Os experimentos foram realizados em triplicata com três amostras independentes (total n=30 vermes por grupo) (HARADA *et al.*, 2016).

2.4.10 Atividade da acetilcolinesterase em *C. elegans*

Para avaliar os possíveis efeitos de inibição do óleo essencial de *Bauhinia unguolata* sobre a enzima Acetilcolinesterase (AChE) em *C. elegans*, a atividade enzimática foi determinada pelo método de Bradford (1976), adaptado por Sedmak e Grossberg (1977) com algumas modificações.

Animais N2 do tipo selvagem foram sincronizados em larvas de primeiro estágio L1 e cerca de 1.000 animais por grupo foram transferidos para placas de 100 mm e tratados com as seguintes concentrações de óleo essencial de *Bauhinia unguolata* (0,0125 mg. mL⁻¹; 0,025 mg.mL⁻¹ ; 0,25 mg.mL⁻¹; 0,75 mg.mL⁻¹) e controles M9 e DMSO. Após os animais atingirem o estágio larval L4, as placas foram lavadas e os vermes transferidos para microtubos para obtenção do homogeneizado por meio de sonicação utilizando ponta sonicadora com amplitude de 50%, por 10s com pausas de 10s até completar um ciclo de 80s. Após a sonicação, o homogeneizado foi centrifugado por 30s a 125g (40°) (Fig. 3). Após a obtenção do homogeneizado de cada grupo tratado ou não com OEPU, foi realizada a quantificação das proteínas, em seguida foi preparada a placa de 96 micropoços adicionando 10 µL de TRIS-HCl 0,5 mol. L⁻¹ a cada micropoço, pH 7,4 e 10 µL do homogeneizado (250 µ.mL⁻¹) e a placa foi incubada por um período de 1 hora. Após o período de incubação, foram adicionados 200 µL de DTNB em cada micropoço e, para início da reação de atividade enzimática, 20 µL de substrato (acetiltiocolina 62 mmol. L⁻¹). As medidas foram realizadas em leitor de microplacas, com excitação de 412 nm por 5 min com intervalos de 30 s. Os valores médios foram calculados.

Figura 3. Etapas do experimento da AChE *in vivo*.



Fonte: Autora. (A) Sincronização de nematóides N2, (B) após 24 horas os ovos eclodiram em estágio larval L1, (C) placas com NGM e OP50 morta, sendo tratadas com OEBU, (D) Obtenção do homogenato do verme, (E), eppendorfs com 200 μ L de homogenato foram centrifugados, (F) sonicador de ponteiras, (G), sonicação do homogenato com com amplitude de 50%, homogenato, de vermes N2 tratados ou não com OEBU, (I) preparo da placa de 96 poços após o período de incubação, adicionou-se DTNB e Acetiltiocolina, mudando a cor de amarelo para azul. (J) Leitura da placa de 96 poços no Leitor de Elisa.

2.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada utilizando GraphPad InStat® (versão 5.0 para Macintosh OSX, GraphPad Software, San Diego, CA). Diferenças significativas entre as médias foram avaliadas por análise de variância unidirecional (ANOVA) seguida de comparação post-hoc com o teste de Bonferroni.

2.6 MODELAGEM DE PROTEÍNAS E VALIDAÇÃO DE ESTRUTURA

Para gerar a estrutura 3D da AChE de *C. elegans* usamos o SSWISS-MODEL (WATERHOUSE et al., 2017). A sequência completa de aminoácidos da AChE foi recuperada do UniProtKB. O BLASTP contra o RCSB Protein Databank foi realizado para encontrar um modelo adequado para modelagem de homologia (BURGOYNE et al., 2006). A estrutura cristalina de (PDB ID: 4EY7) foi selecionada como modelo com base na identidade máxima com porcentagem de gaps mais positivos e mais baixos. Em seguida, o modelo preditivo foi validado utilizando diversas técnicas de validação como Verify3D (BOWIE et al., 1991, LUETHY et al., 1992), que determina a compatibilidade de um modelo atômico

(3D) com sua sequência de aminoácidos.

2.7 ACOPLAMENTO MOLECULAR

As moléculas EOBU foram obtidas no PubChem com os respectivos identificadores: α -Cadineno (CID:12306048), α -Bisabolol (CID: 1549992), α -Bisabolol Óxido A (CID: 6431314), α -Bisabolol Óxido B (CID: 6432283), α -humuleno (CID: 5281520), α -pineno (CID: 440968), α -tujeno (CID: 637518), aromadendreno (CID: 91354), β -cariofileno (CID: 5281515), β -elemeno (CID : 9859094), β -pineno (CID: 440967), canfeno (CID: 6616), copaeno (CID: 12303902), cubenol (CID: 11770062), δ -cadineno (CID: 441005), espatulenol (CID: 92231), Eucaliptol (CID: 2758), Epi- γ -Eudesmol (CID: 6428429), γ -Elemeno (CID: 6432312), γ - Murolene (CID: 12313020), Linalol (CID: 6549), Nerolidol (CID: 5284507), Vanlenceno (CID: 9855795), (2E,6Z)-farnesol (CID: 1549109), Óxido de Cariofileno (CID: 1742210), Donepezil (CID: 3152), Galantamina (CID: 9651), Huperzina A (CID: 449069), Neostigmina (CID: 4456), Rivastigmina (CID: 77991) e Tacrina (CID: 1935).

A estrutura da proteína após modelagem e validação foi utilizada para docking molecular. Os aminoácidos em formação de bolsa ativa foram determinados utilizando o software GRASP, programa baseado em aprendizado de máquina que busca sítios de ligação calculando a acessibilidade dos resíduos ao solvente, características físico-químicas e interações estabelecidas (SANTANA *et al.*, 2020). Os testes de docking molecular foram realizados no software Autodock Vina e o ajuste dos seus respectivos parâmetros, como remoção de água e adição de hidrogênios polares, nas ferramentas Autodock v. 1-5-7 (TROTT; OLSON *et al.*, 2011). Durante a preparação da AChE para docking, todas as moléculas de água foram removidas do meio, hidrogênios polares foram adicionados aos aminoácidos e as cargas de Kollman foram adicionadas às proteínas. As interações moleculares entre os ligantes e os aminoácidos foram demonstradas e analisadas utilizando o visualizador BIOVIA Discovery Studio.

2.7.1 *C. elegans* condições de crescimento e preparações de amostras

Cerca de 15.000 vermes foram mantidos em meio NGM a 20 °C semeado com *E. coli* OP50 inativada por radiação UV, por 44 h na presença da nanoemulsão. Os animais N2 e CL2006 foram lavados com água ultrapura tipo 2 (MiliQ®) repetidamente, a fim de remover as bactérias vermes e evitar a interferência de metabólitos bacterianos nas análises. Ao final do processo, os vermes foram transferidos para tubos criogênicos e congelados a -80°C, a fim de interromper a atividade metabólica dos animais.

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1 PRODUÇÃO DAS FORMULAÇÕES

Objetivando obter nanoemulsões estáveis (sem separação de fases) e com diâmetro das gotículas de óleos essenciais na escala nano, formulações de nanoemulsões do tipo óleo em água (O/A) foram produzidas com o óleo essencial *B. unguolata* e tensoativo Tween 80, nas concentrações de 0.5% e 1%, respectivamente, realizando-se as combinações dos fatores: tempo de homogeneização de 5 e 10 e potência do homogeneizador ultrassônico de 50% de potência. As formulações foram avaliadas por análises macroscópicas (visuais), estresse térmico e diâmetro de gotículas.

3.2 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOEMULSÕES

Na avaliação das nanoemulsões OEBU foram avaliados o tamanho de partícula, potencial zeta, índice de polidispersidade (PdI) e pH das formulações com os tensoativos DMSO, tween 80 a 1% e 0,5%, sonicadas por um período de 5 e 10 min. As maiores concentrações de 15 e 5 mg.ml⁻¹ nas nanoformulações foram utilizadas para avaliar possíveis relações com efeitos biológicos presentes quando os animais foram expostos à emulsão e nanoestruturas de mesma concentração.

As nanoemulsões de 5 mg.ml⁻¹ formuladas com 1% de DMSO apresentaram pH entre 4,9 e 5,9 e tamanhos médios de partícula de 489 e 432 nm quando sonicadas por 5 e 10 min, respectivamente, com diferenças significativas, uma vez que a sonicação por períodos mais prolongados promoveu uma diminuição no tamanho de partícula ($p < 0,05$) (Fig. 4). Aumentos no tamanho de partícula foram observados em formulações com maiores concentrações de óleo de 15 mg.ml⁻¹ a 700 e 675 nm quando sonicadas por 5 e 10 min, respectivamente. Mesmo quando sonicadas por 5 min, as nanoemulsões de 5 e 15 mg.ml⁻¹ apresentaram diferenças significativas, aumentando as partículas na formulação de maior concentração ($p < 0,0001$). Semelhante foi observado em ambas as concentrações quando sonicadas por 10 min, onde apresentaram diferenças significativas com o aumento do tamanho das partículas na concentração de 15 mg.ml⁻¹ ($p < 0,0001$).

O PdI das nanoemulsões, embora diferente entre os períodos e concentrações de sonicação, manteve-se dentro dos padrões esperados para formulações polidispersas. Entretanto, as nanoemulsões de 5 mg.ml⁻¹ sonicadas por 10 min apresentaram maior PdI quando comparadas à formulação de 15 mg.ml⁻¹ com 0,2 e 0,04, respectivamente ($p < 0,05$). A carga superficial das partículas foi negativa, variando entre -55 a -46 mV, e não apresentou diferenças significativas entre os grupos.

As nanoemulsões formuladas com DMSO 0,5% apresentaram pH entre 4,8 e 5,3, além de tamanhos médios de partículas maiores. As nanoformulações de 5 mg.ml⁻¹, quando sonicadas por 5 e 10 min, apresentaram tamanhos de 566 e 713 nm e não apresentaram diferenças significativas no tamanho de partícula. Algo semelhante foi observado nas concentrações de 15 mg.ml⁻¹ sonicadas por 5 (699 nm) e 10 (713 nm) min. No entanto, não houve diferenças significativas. O PDI permaneceu abaixo de 0,4. O potencial zeta apresentou negatividade entre -58 e -50 mV e não apresentou diferenças significativas quando foram feitas comparações entre as mesmas concentrações em períodos diferentes.

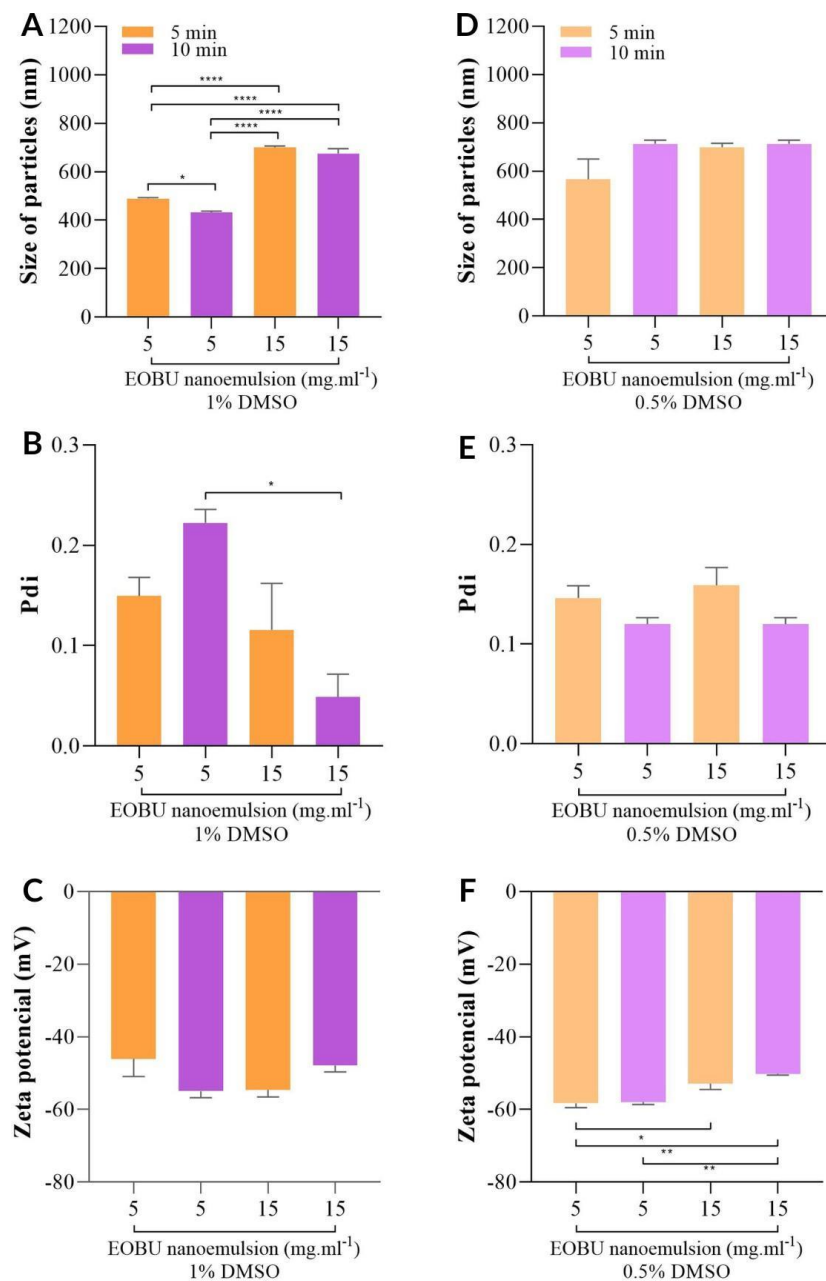
As nanoemulsões formuladas com 1% de tween 80 apresentaram pH entre 4,6 a 5,8 e os menores tamanhos de partícula quando comparadas as formulações com DMSO e tween 20, (Fig. 5). Quanto ao tamanho de partícula, a concentração de 5 mg.ml⁻¹ obteve tamanhos de 104 e 67 nm quando sonificado por 5 e 10 min, respectivamente, com diminuição de tamanho durante o período de sonicação mais prolongado ($p < 0,0001$). Diminuições semelhantes entre os tempos de sonicação foram observadas em nanoemulsões de 15 mg.ml⁻¹ com 177 e 89 nm aos 5 e 10 min de sonicação ($p < 0,0001$), respectivamente. O PDI permaneceu dentro dos padrões esperados para nanoemulsões polidispersas abaixo de 0,4, com nanoemulsões de 5 mg.ml⁻¹ entre 0,2 e 0,1, 5 e 10 min após a sonicação, respectivamente ($p < 0,0001$). As nanoformulações de 15 mg.ml⁻¹ também apresentaram diminuição do PDI após sonicação por 10 min, de 0,2 para 0,1 ($p < 0,001$). O potencial zeta das nanoemulsões com 1% de tween 80 apresentou cargas próximas da neutralidade em torno de -5 mV.

As nanoformulações com 0,5% de tween 80, quando sonicadas por 5 e 10 min, apresentaram valores de pH entre 101, 46 nm e 173 e 156 nm nas concentrações de 5 e 15 mg.ml⁻¹, respectivamente. Nas nanoformulações de 5 mg.ml⁻¹, o maior tempo de sonicação promoveu redução significativa de partículas ($p < 0,0001$), enquanto nas formulações de 15 mg.ml⁻¹, não foram detectadas diferenças significativas de tamanho entre os tempos. Entretanto, as nanoemulsões de 5 mg.ml⁻¹ sonicadas por 5 min não atingiram os valores esperados abaixo de 0,4 para amostras polidispersas. Contudo, as demais concentrações e períodos permaneceram dentro dos intervalos apropriados. O potencial de superfície permaneceu negativo e próximo da neutralidade como observado nas nanoemulsões com 1% de tween 80.

As nanoemulsões com 1% de tween 20, quando sonicadas por 5 e 10 min, apresentaram pH entre 3,5 e 3,6 e tamanhos de 201 e 166 nm e 223 e 205 nm, nas concentrações de 5 e 15 mg.ml⁻¹, respectivamente. Nas formulações de 5 mg.ml⁻¹, 10 min de

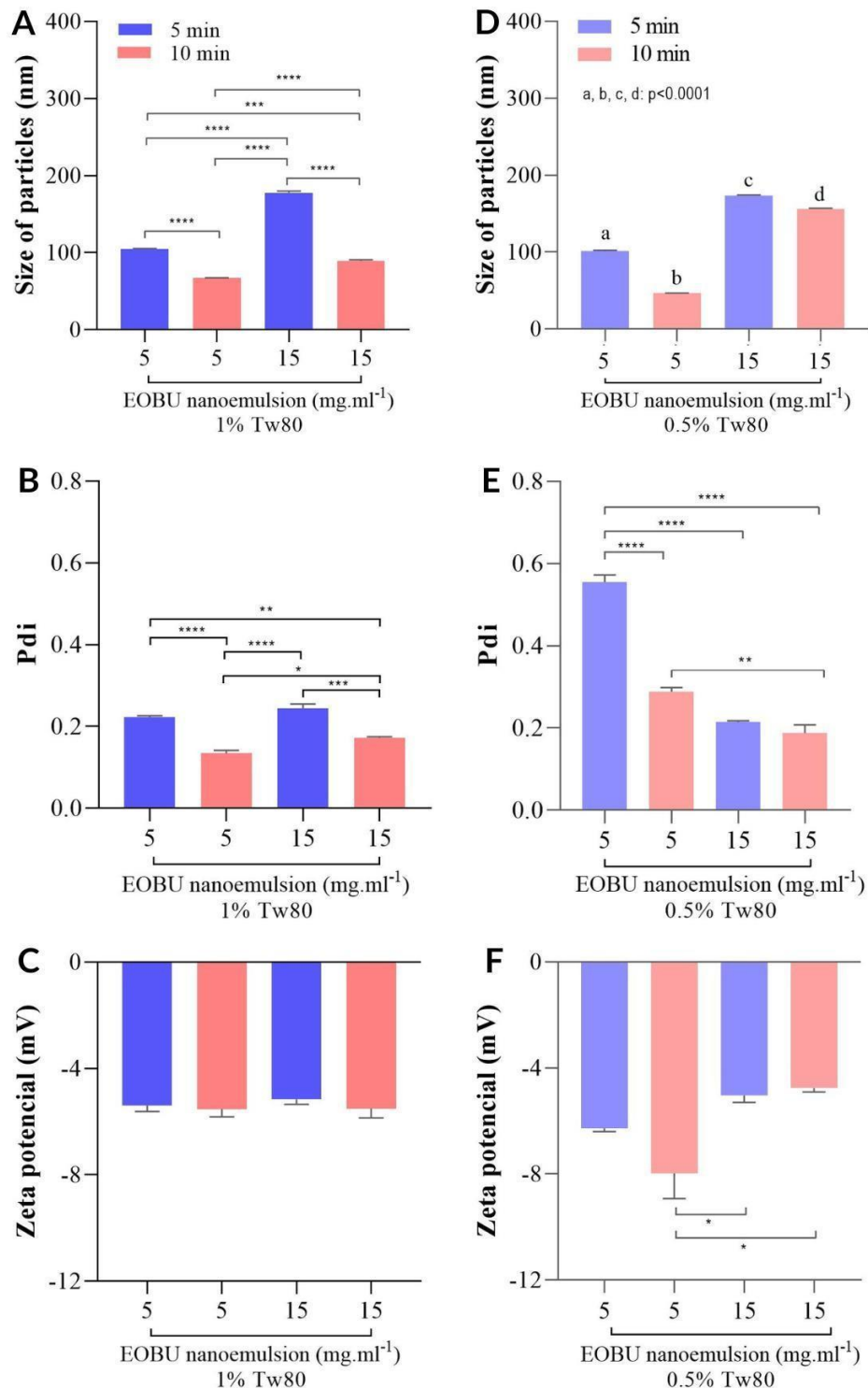
sonicação promoveram diminuição no tamanho das partículas ($p < 0,001$), e algo semelhante foi observado nas concentrações de 15 mg.ml^{-1} ($p < 0,05$). No PDI as nanoemulsões permaneceram abaixo de 0,4, e o potencial de superfície foi negativo com valores de -9 a -11 mV. O comportamento das partículas com 0,5% de tween 20 mudou, pois as sonicações de 5 e 10 min promoveram tamanhos de 201 e 192 e 240 e 225, nas concentrações de 5 e 10 mg.ml^{-1} , respectivamente. Porém, não observamos diferenças significativas entre os tempos nas formulações de 5 mg.ml^{-1} , o que já foi observado nas concentrações de 15 mg.ml^{-1} com diminuição do tamanho das partículas após 10 min de sonicação ($p < 0,05$). O PDI permaneceu abaixo de 0,4, o potencial zeta das partículas foi negativo e o pH das nanoemulsões foi 6.

Figura 4. Caracterização de nanoemulsões em DMSO do OEBU em diferentes tempos de sonicação (5 e 10 minutos) e concentrações.



Fonte Autora: Tamanho das nanopartículas (A, D), índice de polidispersidade (Pdi) (B, E) e potencial Zeta (C, F) em nanoemulsões preparadas em 1% e 0,5% de DMSO como surfactante. Os dados são representados como mim e $\pm\text{SEM}$. A significância estatística foi determinada por ANOVA unidirecional seguida pelo teste de Bonferroni. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, **** $p < 0,0001$.

Figura 5. Caracterização de nanoemulsões em tween 80 de OEBU em diferentes tempos de sonicação (5 e 10 minutos) e concentrações.



Fonte: Autor. Tamanho das nanopartículas (A, D), índice de polidispersidade (Pdi) (B, E) e potencial Zeta (C, F) em nanoemulsões preparadas com Tween 80 a 1% e 0,5% como surfactante. Os dados são representados como mim e $\pm SEM$. A significância estatística foi determinada por ANOVA unidirecional seguida pelo teste de Bonferroni. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$.

3.3 ESTABILIDADE DAS NANOEMULSÕES

As nanoformulações de 5 e 15 $mg.ml^{-1}$ apresentaram aspectos macroscópicos consistentes com nanoemulsões, onde não houve cremação, craqueamento ou separação de fases após o preparo. As nanoemulsões foram submetidas a tensões geradas por força centrífuga para observar suas estabilidades cinéticas.

Nanoemulsões formuladas com 1% de DMSO apresentaram clara instabilidade nas simulações de estabilidade cinética. A centrifugação a 5 $mg.ml^{-1}$ por 1000 rpm gerou uma pequena camada de creme, embora a formulação permanecesse branca com pequenas alterações. Contudo, quando foi gerada uma força de 2.000 rpm, a formulação mostrou sinais claros de separação com aumento de cremação e separação. A maior centrifugação de 3000 rpm gerou aumento na cremação. Nas formulações de 15 $mg.ml^{-1}$, 1000 rpm geraram cremação, seguida de modificação do aspecto macroscópico da nanoemulsão. Além disso, quando submetida a 2.000 rpm, a formulação sonicada por 5 min (Fig.6,E.1) apresentou aumento significativo na cremação, enquanto a nanoemulsão sonicada por 10 min apresentou aparente craqueamento com a separação das fases oleosa e aquosa. O mesmo fenômeno foi observado em ambos os tempos de sonicação após centrifugação a 3000 rpm (Fig.6)

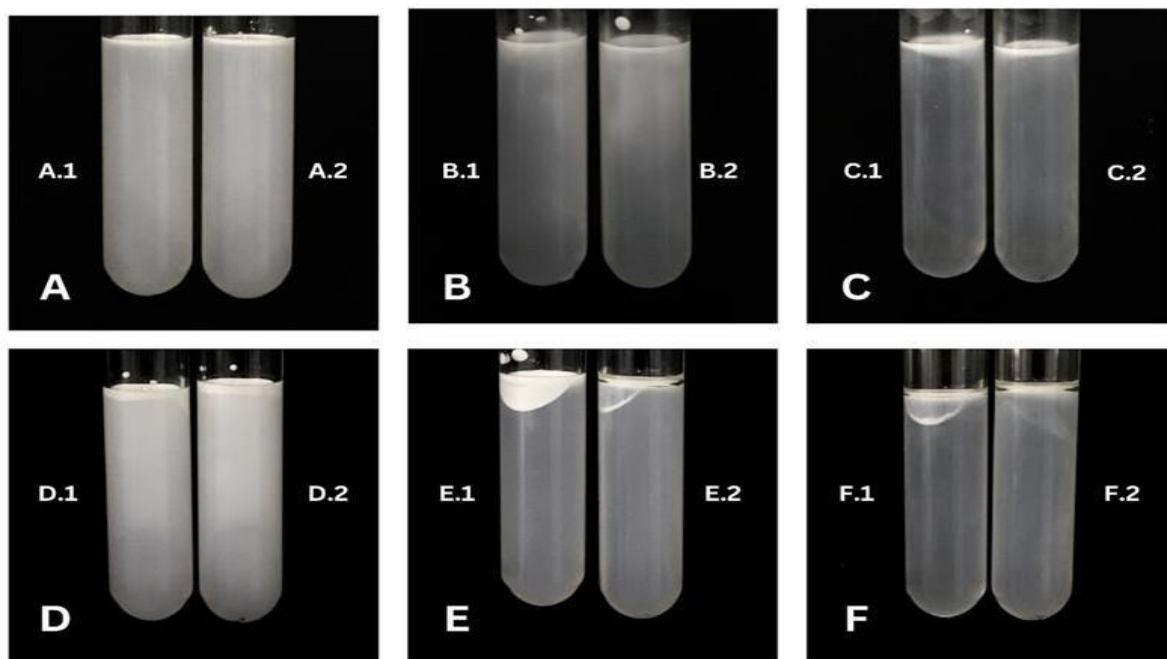
O papel da concentração de DMSO na estabilidade das nanoemulsões ficou evidente. A menor concentração de 0,5% de DMSO também apresentou instabilidade e separação de fases. Após centrifugação a 1000 rpm, foi gerada cremação na superfície. Além disso, centrifugações de 2.000 e 3.000 rpm apresentaram craqueamento das formulações (Fig.7).

Nanoemulsões com 0,5% e 1,0% de tween 80 apresentaram alta estabilidade cinética após centrifugação, sem sinais de cremação ou rachaduras (Fig.8 e 9). As nanoformulações de 5 e 15 $mg.ml^{-1}$ apresentaram aspectos macroscópicos consistentes com nanoemulsões, onde não houve cremação, craqueamento ou separação de fases após o preparo das formulações. As nanoemulsões foram submetidas a tensões geradas por força centrífuga para observar suas estabilidades cinéticas.

A menor concentração de 0,5% de DMSO também apresentou instabilidade e separação de fases. Após centrifugação a 1000 rpm, foi gerada cremação na superfície. Além disso, centrifugações de 2.000 e 3.000 rpm apresentaram craqueamento das formulações. A

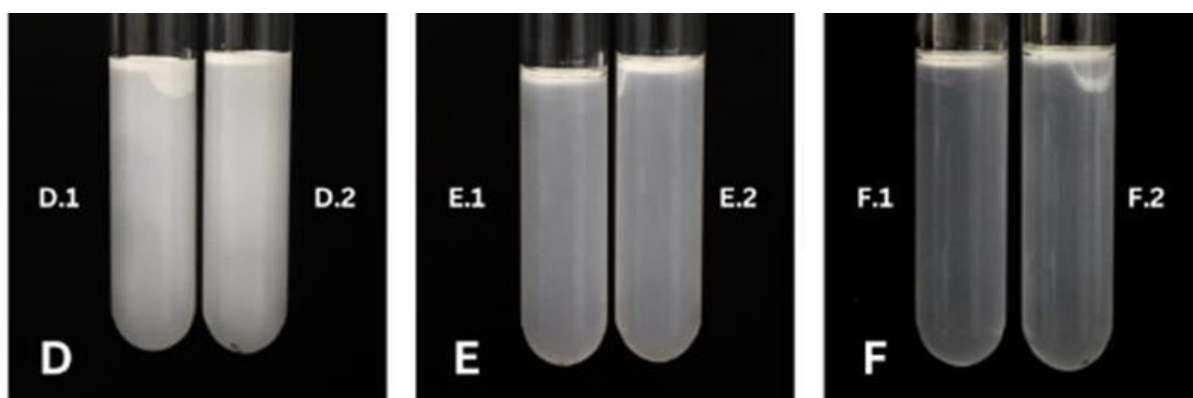
estabilidade das nanoemulsões com 1% e 0,5% de Tween 80 foi elevada após a centrifugação, sem sinais de cremação ou rachaduras. Porém, a estabilidade das nanoemulsões com tween 20 não foi alcançada devido à sua natureza ácida, fator que deve ser considerado em estudos futuros, uma vez que *C.elegans* não suporta fisiologicamente pH ácido.

Figura 6. Estabilidade de nanoformulações compostas por DMSO a 1% após centrifugação



Fonte Autora: Em (A) 5 mg.ml⁻¹ DMSO a 1% 1000 rpm. (A.1) 5 mg.ml⁻¹ 5 min. (A.2) 5 mg.ml⁻¹ 10 min. (B) 5 mg.ml⁻¹ DMSO a 1% 3000 rpm. (B.1) 5 mg.ml⁻¹ 5 min. (B.2) 5 mg.ml⁻¹ 10 min. (C) 5 mg.ml⁻¹ DMSO a 1% 2000 rpm. (C.1) 5 mg.ml⁻¹ 5 min. (C.2) 5 mg.ml⁻¹ 10 min. (D) 15 mg.ml⁻¹ DMSO a 1% 1000 rpm. (D.1) 15 mg.ml⁻¹ 5 min. (D.2) 15 mg.ml⁻¹ 10 min. (E) 15 mg.ml⁻¹ DMSO a 1% 2000 rpm. (E.1) 15 mg.ml⁻¹ 5 min. (E.2) 15 mg.ml⁻¹ 10 min. (F) 15 mg.ml⁻¹ DMSO a 1% 3000 rpm. (F.1) 15 mg.ml⁻¹ 5 min. (F.2) 15 mg.ml⁻¹ 10 min.

Figura 7. Estabilidade de nanoformulações compostas por 0,5% de DMSO após centrifugação.



Fonte autor: (D) 15 mg.ml⁻¹ DMSO 0,5% 1000 rpm. (D.1) 15 mg.ml⁻¹ 5 min. (D.2) 15 mg.ml⁻¹ 10 min. (E) 15 mg.ml⁻¹ DMSO 0,5% 2000 rpm. (E.1) 15 mg.ml⁻¹ 5 min. (E.2) 15 mg.ml⁻¹ 10 min. (F) 15 mg.ml⁻¹ DMSO 0,5%, 3000 rpm. (F.1) 15 mg.ml⁻¹ 5 min. (F.2) 15 mg.ml⁻¹ 10 min.

Figura 8. Estabilidade das nanoformulações compostas por tween 80 a 0,5% após centrifugação.

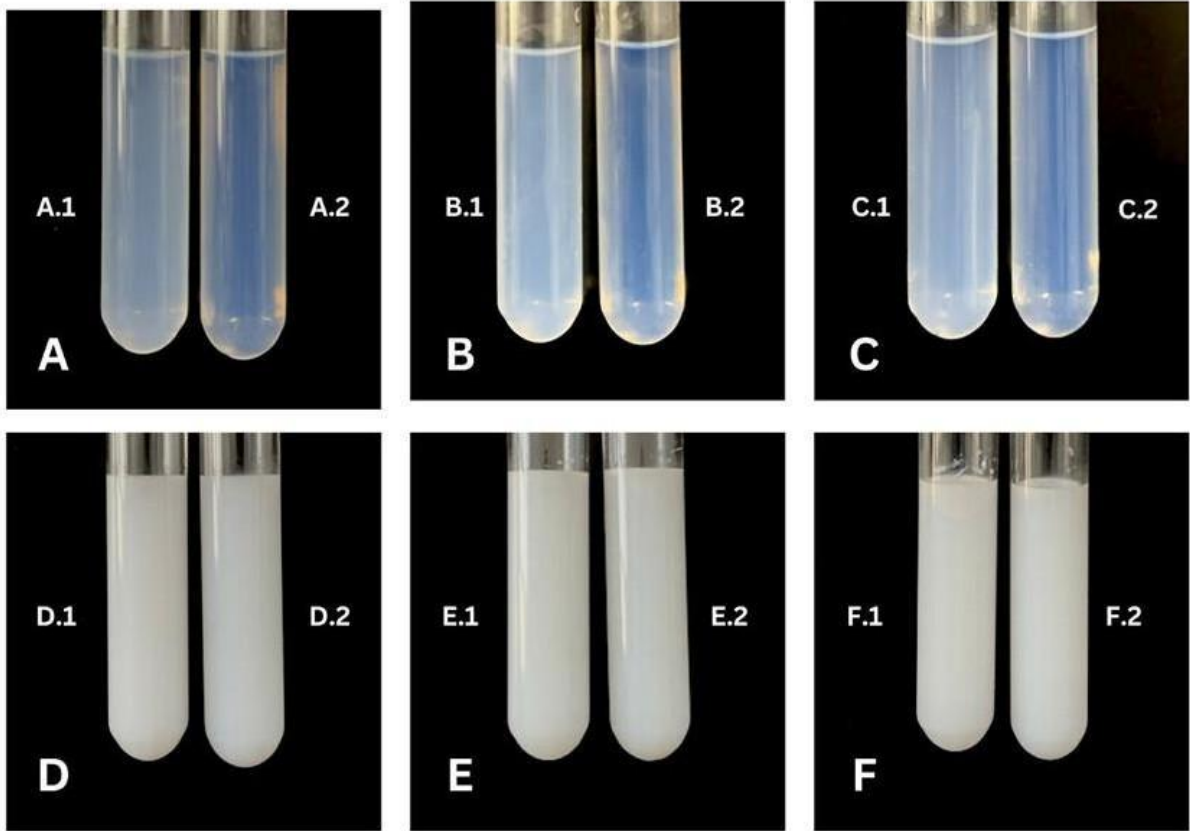
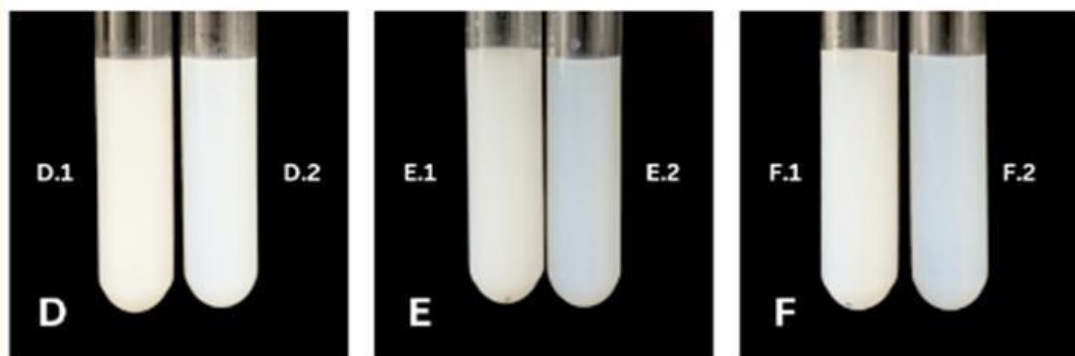


Figura 6 - Estabilidade das nanoformulações compostas por Tween 80 a 0,5% após centrifugação. (A) 5 mg.ml^{-1} Tween 80 0,5% 1000 rpm. (A.1) 5 mg.ml^{-1} 5 min. (A.2) 5 mg.ml^{-1} 10 min. (B) 5 mg.ml^{-1} Tween 80 0,5% 2000 rpm. (B.1) 5 mg.ml^{-1} 5 min. (B.2) 5 mg.ml^{-1} 10 min. (C) 5 mg.ml^{-1} Tween 80 0,5% 3000 rpm. (C.1) 5 mg.ml^{-1} 5 min. (C.2) 5 mg.ml^{-1} 10 min. (D) 15 mg.ml^{-1} Tween 80 0,5% 1000 rpm. (D.1) 15 mg.ml^{-1} 5 min. (D.1) 15 mg.ml^{-1} 10 min. (E) 15 mg.ml^{-1} Tween 80 0,5% 2000 rpm. (E.1) 15 mg.ml^{-1} 5 min. (E.1) 15 mg.ml^{-1} 10 min. (F) 15 mg.ml^{-1} Tween 80 0,5% 3000 rpm. (F.1) 15 mg.ml^{-1} 5 min. (F.1) 15 mg.ml^{-1} 10 min.

Figura 9. Estabilidade de nanoformulações compostas por Tween 80 a 1% após centrifugação

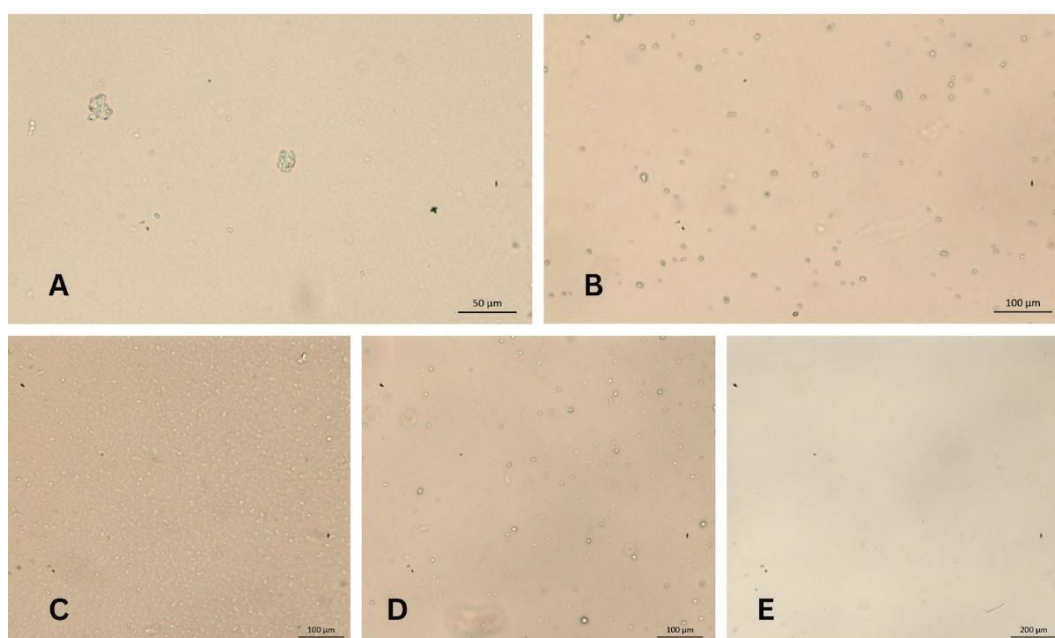


Fonte Autora: Em (D) 15 mg.ml⁻¹ Tween 80 1% 1000 rpm. (D.1) 15 mg.ml⁻¹ 5 min. (D.2) 15 mg.ml⁻¹ 10 min. (E) 15 mg.ml⁻¹ Tween 80 1% 2000 rpm. (E.1) 15 mg.ml⁻¹ 5 min. (E.2) 15 mg.ml⁻¹ 10 min. (F) 15 mg.ml⁻¹ Tween 80 1% 3000 rpm. (F.1) 15 mg.ml⁻¹ 5 min. (F.2) 15 mg.ml⁻¹ 10 min.

3.4 MICROSCÓPIA OPTICA

As imagens exibem uma dispersão relativamente homogênea, sugerindo que as nanopartículas estão bem distribuídas. A variação nas concentrações (5 mg.mL⁻¹ e 15 mg.mL⁻¹) e no tempo de exposição (5 min e 10 min) não apresentaram grandes aglomerações visíveis, o que pode indicar estabilidade das nanoformulações (Fig. 10).

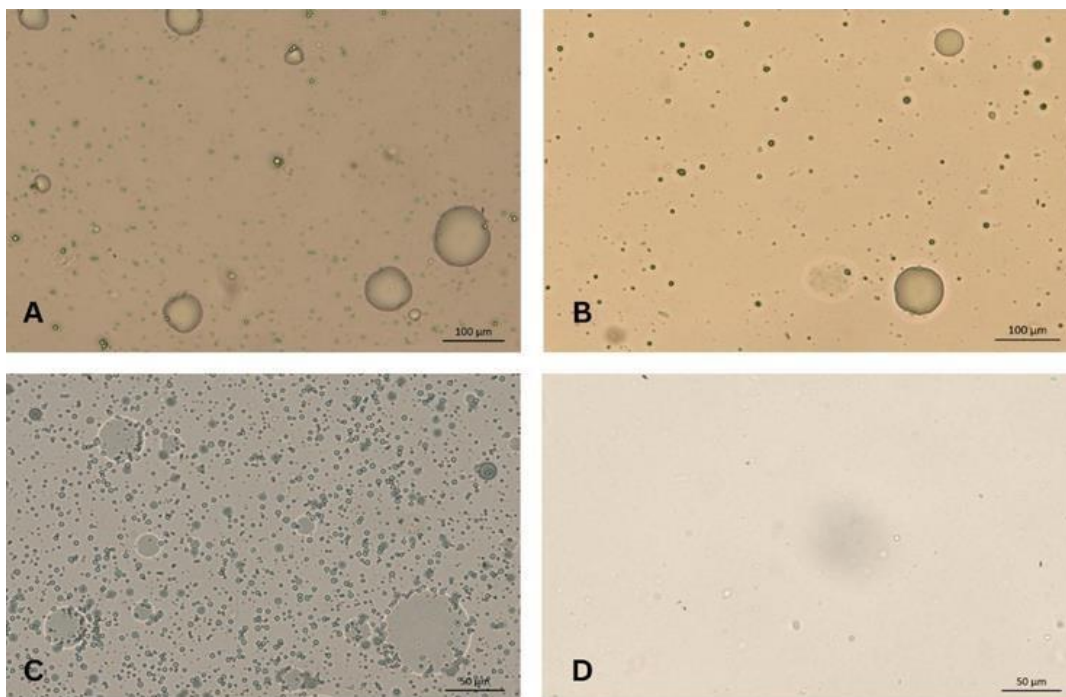
Figura 10. Fotografia de microscopia óptica de placas contendo nanoformulações de OEBU



Fonte autor: (A) 5 mg.ml⁻¹ 5 min, barra de escala em 50 μm. (B) 5 mg.ml⁻¹ 10 min, barra de escala em 100 μm. (C) 15 mg.ml⁻¹ 5 min, barra de escala em 100 μm. (D) 15 mg.ml⁻¹ 10 min, barra de escala em 100 μm. (E) Branco, barra de escala em 200 μm.

As imagens mostram gotículas dispersas, típicas de emulsões. O tamanho e a distribuição das gotículas variam de acordo com a concentração e o tempo de preparo. As micrografias (A, B, C, D) indicam que a emulsão forma gotículas maiores em comparação com as nanoformulações, o que pode impactar a estabilidade e biodisponibilidade do OEBU. A imagem (D), correspondente à menor concentração (0,25 mg.mL⁻¹), mostra uma dispersão mais fina e homogênea, o que pode indicar maior estabilidade da emulsão nessa condição.

Figura 11. Fotografia de microscopia óptica de placas contendo emulsão de OEUBU.

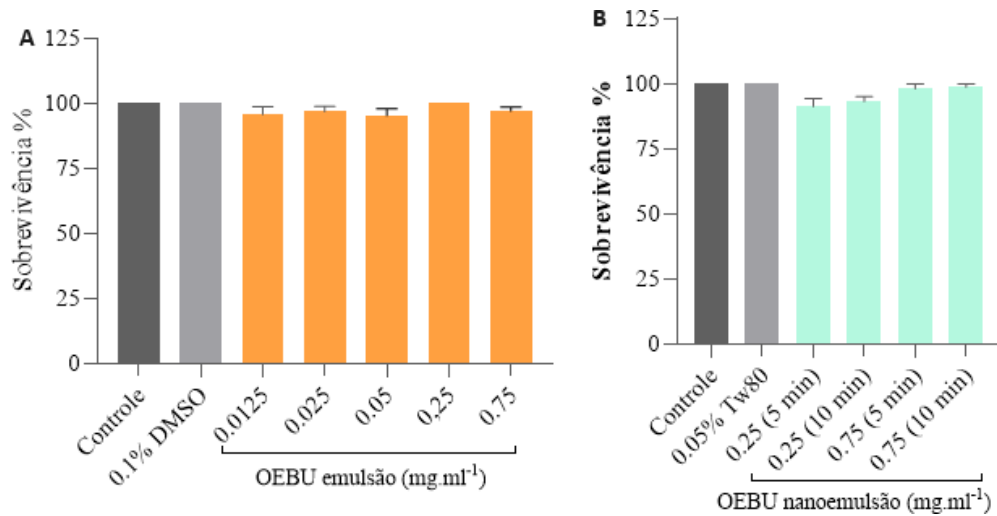


Fonte Autora: (A) 5 mg.ml⁻¹, barra de escala em 100 μm. (B) 0,5, barra de escala em 100 μm. (C) 15 mg.ml⁻¹, barra de escala em 50 μm. (D) 0,25, barra de escala em 50 μm.

3.5 ATIVIDADE BIOLÓGICA DAS FORMULAÇÕES de *Bauhinia unguolata* EM *C. elegans*

Considerando os parâmetros de caracterização, as nanoemulsões preparadas com o surfactante Tween 80 (0,05% de concentração final) foram destinadas aos testes toxicológicos *in vivo* e comparadas às emulsões preparadas com DMSO (0,1% de concentração final). A sobrevivência de *C. elegans* não foi significativamente afetada em nenhuma formulação testada (Fig. 12A e 12B). Isso indica que as concentrações poderão ser utilizadas nos próximos ensaios. A concentração das nanoemulsões escolhidas para os testes baseou-se na maior concentração que apresentasse estabilidade na caracterização. Além disso, a emulsão de 0,25 e 0,75 mg.mL⁻¹ de OEUBU induziu alterações significativas em comparação ao grupo controle de 0,1% de DMSO. Assim, buscamos se a nanoemulsão OEUBU poderia apresentar perfil de toxicidade diferente da emulsão OEUBU.

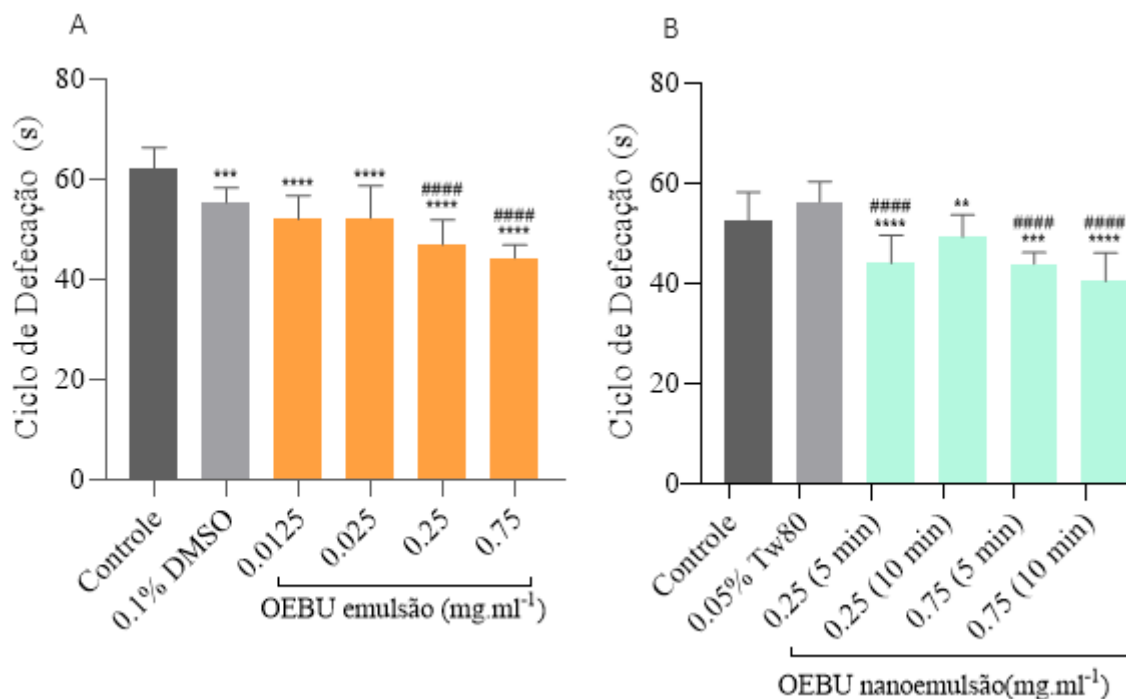
Figura 12. Sobrevivência de *C. elegans* após exposição à emulsão e nanoemulsão de OEBU.



Fonte Autora: O grupo DMSO 0,1% foi utilizado como controle de veículo para emulsão (A) e TW80 0,05% para nanoemulsão (B). Os animais (tipo selvagem, N2) foram mantidos a 20 °C e pontuados até 72 h. Os dados são representados como porcentagem de animais vivos (20-30 animais por placa em três ensaios independentes), $me \pm SEM$. A significância estatística foi determinada por ANOVA unidirecional seguida pelo teste de Bonferroni.

3.6 MUDANÇAS COMPORTAMENTAIS

3.6.1 Ritmo de defecação e comportamento alimentar de *C. elegans* sob emulsão e nanoemulsão de OEBU

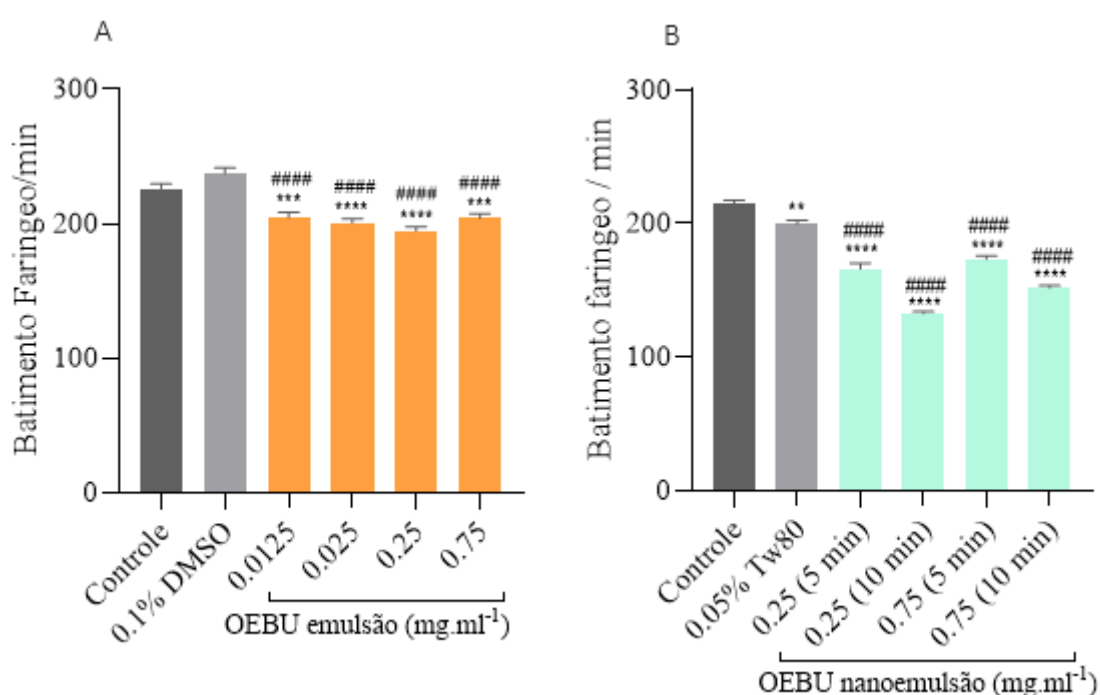
Figura 13. Ciclos de Defecação do *C. elegans*

Fonte Autor: Os ciclos de defecação de *C. elegans* foram reduzidos sob exposição à emulsão e nanoemulsão do óleo essencial de *Bauhinia unguolata* (OEBU). Os ciclos de defecação de animais do tipo selvagem no estágio larval L4 (44 h, n=18) foram analisados após emulsão OEBU/0,1% de surfactante DMSO (A) e nanoemulsão de OEBU/0,05% de surfactante Tw80 (B). O tampão M9 foi usado como controle. Os dados são apresentados em médias de três intervalos de defecação \pm SEM e analisados utilizando ANOVA unidirecional seguido pelo teste de Bonferroni. (*) Indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle: ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$. (#) Denota uma diferença estatisticamente significativa em comparação ao grupo surfactante: ##### $p < 0,0001$.

A exposição dos vermes ao OEBU alterou o movimento peristáltico no trato intestinal dos vermes. Os ciclos de defecação reduziram em 0,0125, 0,025, 0,25 e 0,75 mg.mL^{-1} de emulsão OEBU ($p < 0,001$) em comparação ao controle (Fig. 13A). Quando comparado ao grupo DMSO 0,1%, apenas 0,25 e 0,75 mg.mL^{-1} de emulsão de OEBU reduziram significativamente os ciclos de defecação dos nematoides ($p < 0,0001$). As nanoemulsões também alteram o movimento peristáltico, reduzindo os ciclos de defecação. Não houve diferença significativa entre o surfactante tween 80 em comparação ao controle. No entanto, houve uma diferença significativa entre os grupos controle e 0,25 (5 min), 0,75 (10 min) mg.mL^{-1} de nanoemulsão de OEBU ($p < 0,0001$) e 0,25 (10 min, $p < 0,01$) e 0,75 (5 min, $p < 0,001$) mg.mL^{-1} grupos de nanoemulsão EOBUE (Fig. 13B). Todas as concentrações e tempos testados, exceto a nanoemulsão de 0,25 (10 min) mg.mL^{-1} de OEBU, foram diferentes do surfactante tween 80 ($p < 0,0001$). A redução nos tempos do ciclo de defecação significa que os nematóides defecam com mais frequência.

A ingestão é a via natural de exposição mais comum para *C. elegans*, pois semelhante aos humanos, seu processo de alimentação envolve a ingestão de alimentos, digestão, absorção de nutrientes e defecação (ZI et al., 2021) . A defecação, por exemplo, é um processo rítmico conhecido como ciclo de defecação, que é definido como o intervalo entre duas contrações musculares da parede posterior do corpo bem-sucedidas (ZHANG et al., 2021) . Esse processo está ligado à função neural e, quando não funciona corretamente, pode estar associado à disfunção neurológica mediada pelo cálcio (JIANG et al., 2022).

Figura 14. Comportamento Alimentar de *C. Elegans*.



Fonte autor: O comportamento alimentar de *C. elegans* foi reduzido sob exposição à emulsão e nanoemulsão de óleo essencial de *Bauhinia unguolata* (OEBU). O bombeamento faríngeo foi pontuado por 60 segundos em animais do tipo selvagem no estágio larval L4 (44 h, n = 18) após a exposição à emulsão OEBU/0,1% de surfactante DMSO (A) e nanoemulsão de EOBU/0,05% de surfactante Tw80 (B). O tampão M9 foi usado como controle. Os dados são apresentados em média \pm SEM e analisados utilizando ANOVA unidirecional seguido pelo teste de Bonferroni. (*) Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle: ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$. (#) Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo surfactante: #### $p < 0,0001$.

O tratamento com emulsão e nanoemulsão do OEBU reduziu a taxa de bombeamento faríngeo. Na emulsão OEBU, houve diferença significativa entre o grupo controle e 0,0125 e 0,75 mg.mL⁻¹ ($p < 0,001$), e 0,25 e 0,025 mg.mL⁻¹ ($p < 0,0001$) (Fig. 14A). Além disso,

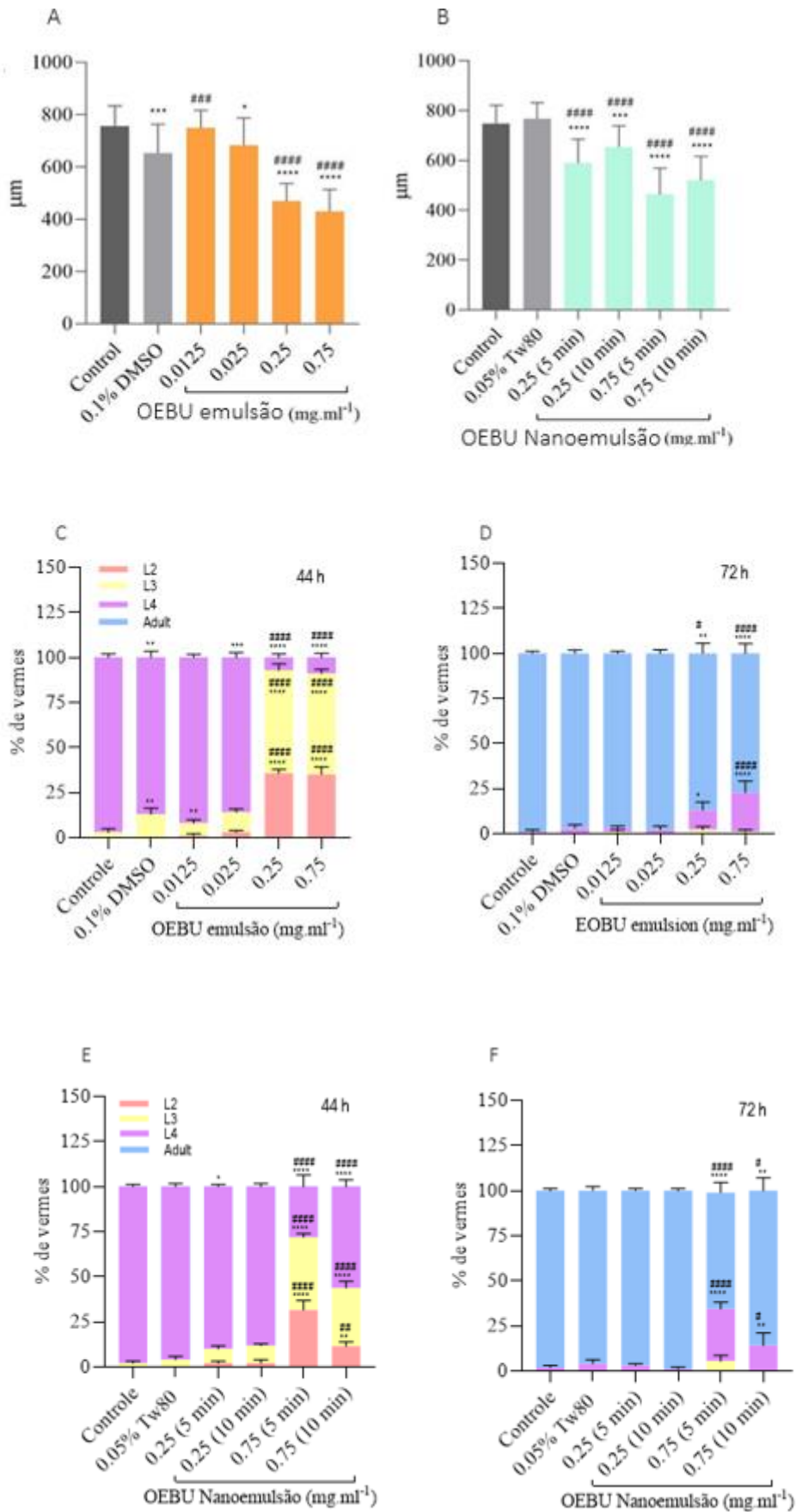
todas as concentrações testadas foram diferentes do grupo DMSO 0,1% ($p < 0,0001$). Ao comparar as nanoemulsões, houve diferença significativa entre o surfactante 0,05% tween 80 e o grupo controle ($p < 0,01$). Todas as concentrações de nanoemulsão OEUBU testadas apresentaram comportamento alimentar reduzido em comparação com o controle e 0,05% entre 80 grupos de surfactantes (Fig. 14B, $p < 0,0001$).

O bombeamento faríngeo está relacionado ao comportamento alimentar de *C. elegans*. Reflete a detecção sensorial e subsequente sinalização neuronal, resultando em um aumento ou diminuição na frequência do ciclo de contração-relaxamento. Este processo serve como um bioensaio rico para rastrear a modulação química (CALAHORRO; HOLDEN-DYE; O'CONNOR, 2021). A faringe depende da estimulação dos músculos faríngeos pela acetilcolina, conduzindo o ciclo de contração-relaxamento que facilita a ingestão de alimentos. Este comportamento, facilmente avaliado, oferece uma rota distinta para testar a intoxicação e recuperação da acetilcolinesterase (IZQUIERDO et al., 2021).

3.6.2 Comprimento corporal, desenvolvimento e reprodução de *C. elegans* sob OEUBU em exposição a emulsões e nanoemulsões

C. elegans progride no ciclo de vida através de quatro estágios larvais (L1, L2, L3 e L4) e na idade adulta. Todas essas mudanças ocorrem em 72 horas (ovo até a idade adulta). No presente estudo, acompanhamos os vermes tratados até a idade adulta para verificar quaisquer modificações no desenvolvimento larval e consideramos dois pontos finais importantes: estágio larval e comprimento do corpo (Fig. 15).

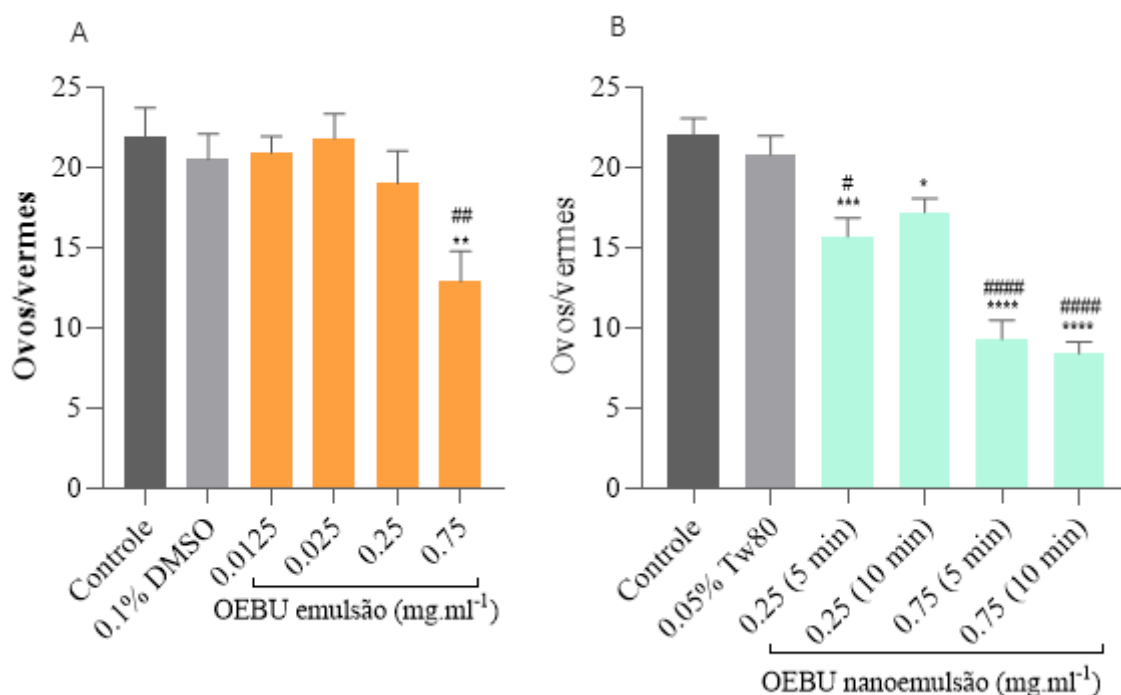
Em relação ao comprimento corporal, a exposição a 0,1% de DMSO diminuiu o tamanho corporal de *C. elegans* em comparação ao grupo controle ($p < 0,001$), bem como aos grupos tratados com 0,025 ($p < 0,05$), 0,25 e 0,75 mg.ml⁻¹ ($p < 0,0001$) Emulsão OEUBU (Fig. 15A). A exposição à nanoemulsão OEUBU reduziu o comprimento corporal em todas as formulações testadas em comparação ao grupo controle ($p < 0,0001$) e ao veículo 0,05% tween 80, bem como aos grupos tratados com 0,25 (5 min, $p < 0,0001$), 0,75 (5 min e 10 min, $p < 0,0001$) e 0,25 mg.mL⁻¹ (10 min, $p < 0,001$) (Fig. 15B). O atraso no desenvolvimento de *C. elegans* foi mais evidente em 44 h do que em 72 h quando tratado com OEUBU tanto em emulsão quanto em nanoemulsão com dose controle de 0,75 mg.mL⁻¹ (5 min e 10 min, $p < 0,0001$) (Fig. 15C, 15D, 15E e 15F).

Figura 15. O comprimento corporal e o desenvolvimento de *C. elegans*

Fonte Autora: O comprimento corporal e o desenvolvimento de *C. elegans* foram impactados pelas exposições à emulsão e nanoemulsão do óleo essencial de *Bauhinia unguolata* (OEBU). O comprimento corporal foi medido em animais do tipo selvagem no estágio larval L4 (44 h, n = 18) após a exposição à emulsão OEBU/0,1% de surfactante DMSO (A) e nanoemulsão de EOBU/0,05% de surfactante Tw80 (B). A progressão larval (L1, L2, L3, L4 e adulto) foi pontuada às 44 h (C, E) e 72 h (D, F). O tampão M9 foi usado como controle. Os dados são apresentados em média \pm SEM e analisados utilizando ANOVA unidirecional seguido pelo teste de Bonferroni. (*) Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$. (#) Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo surfactante: # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$, e #### $p < 0,0001$.

Quanto aos impactos na reprodução de *C. elegans* expostos ao tratamento com o surfactante DMSO 0,1%, não houve diferença significativa em relação à emulsão OEBU nas concentrações de 0,0125, 0,025 e 0,25 mg.mL⁻¹, exceto para o grupo 0,75 mg.mL⁻¹ (Fig.7A, $p < 0,01$). Por outro lado, a nanoemulsão OEBU 0,05%/tween 80 (Fig.7B) apresentou diferença significativa em relação ao controle e aos grupos 0,25 mg.mL⁻¹ (5 min, $p < 0,001$), 0,25 mg.mL⁻¹ (10 min, $p < 0,05$), 0,75 mg.mL⁻¹ (5 e 10 min, $p < 0,0001$), e em relação ao surfactante, os grupos 0,75 mg.mL⁻¹ (5 e 10 min, $p < 0,0001$) e 0,25 mg.mL⁻¹ (5 min, $p < 0,05$) apresentou diferença significativa em relação ao surfactante, exceto para o grupo 0,25 mg.mL⁻¹ (10 min). A exposição à nanoemulsão OEBU reduziu a produção de ovos em comparação à emulsão.

Figura 16. Os impactos na reprodução de *C. elegans* em OEBU

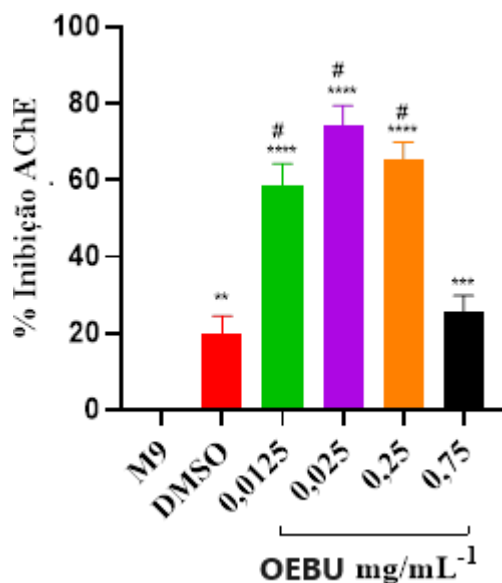


Fonte Autora: Os impactos na reprodução de OEBU de *C. elegans* foram maiores na nanoemulsão de óleo essencial de *Bauhinia unguolata* (OEBU) do que na emulsão de OEBU. Os ovos no útero foram pontuados em animais adultos do tipo selvagem (72 h, n = 10) após a exposição à emulsão OEBU/0,1% de surfactante DMSO (A) e nanoemulsão/0,05% de surfactante Tw80 (B). O tampão M9 foi usado como controle. Os dados são apresentados em média \pm SEM e analisados utilizando ANOVA unidirecional seguido pelo teste de Bonferroni. (*) Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$. (#) Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo surfactante: # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$, #### $p < 0,0001$.

3.7 Inibição da enzima AChE com emulsão do OEBU

A atividade da enzima AChE após a exposição ao OEBU, foi caracterizada por uma redução em todas as concentrações testadas se comparadas ao grupo controle M9 (Fig. 17). O OEBU, inibiu a atividade da enzima, correspondendo aos resultados positivos obtidos *in vitro*, inibindo a enzima AChE em 74,4% na concentração de 0,025 $\mu\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, 58,4% em 0,0125 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, 65,5% em 0,25 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ e 25,6% em 0,75 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, Figura 17, por conseguinte, foi verificado que a inibição da atividade da enzima AChE produzida pelo OEBU não é proporcional à concentração de enzimas que estão ligadas pelo óleo, uma vez que não foi possível verificar um efeito dose-dependente entre as diferentes concentrações do óleo avaliado *in vivo*. Em testes *in vitro* extratos de flores (SANTOS et al 2011) e o óleo essencial das folhas de *Bauhinia unguolata* (MEDEIROS et al 2016) foram relatados como inibidor da acetilcolinesterase, no qual o óleo essencial das folhas de *Bauhinia unguolata* apresentou inibição dessa enzima em torno de 95%, mostrando que nossos resultados estão em concordância aos resultados reportados anteriormente. De acordo com a pressuposição anterior, pode-se sugerir que o OEBU apresentou eficácia na inibição da atividade da enzima AChE *in vivo* em todas as concentrações testadas, uma vez que os resultados foram significativos em três das concentrações testadas. No entanto, um aumento na concentração do OEBU não produziu uma resposta inibitória adicional significativa, já que na concentração maior, não apresentou uma diferença significativa em relação aos grupos não controle. Esse estado pode ter sido habitualmente alcançado devido à ocupação de todos os sítios alvos da enzima responsável pelo efeito do óleo essencial. No entanto, este resultado indica que o OEBU, tem potencial de inibição da enzima AChE, nas menores concentrações testadas.

Figura 17. Inibição da AChE pela emulsão do (OEBU).

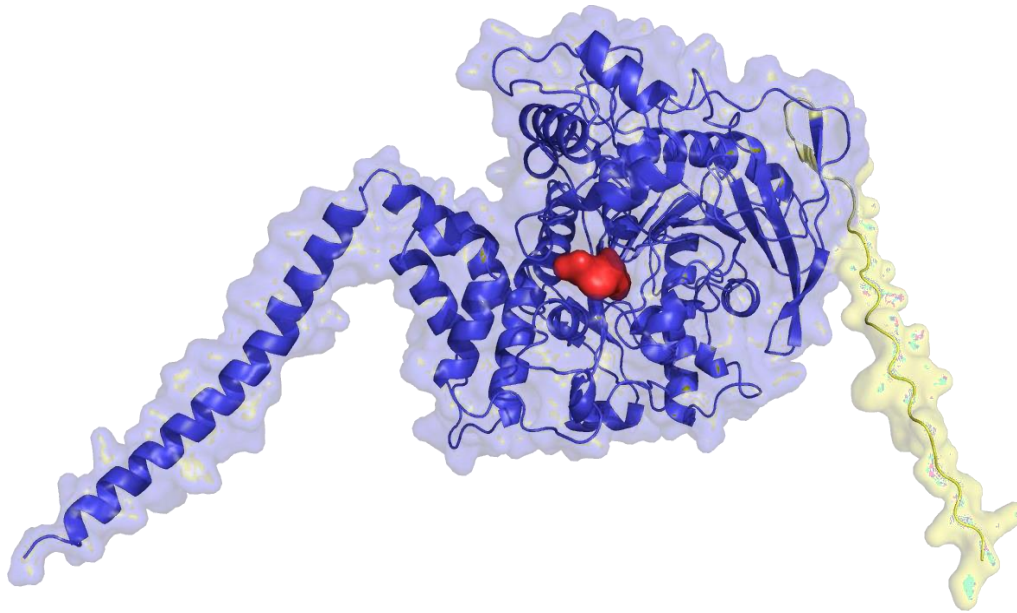


Fonte Autora: Emulsão do óleo essencial de *Bauhinia unguolata* (OEBU). Os vermes ficaram expostos por 48 horas. Os dados representam a percentagem média de inibição da AChE. **** p<0,0001, ** p<0,0018 comparado ao grupo M9. #p<0,0001. por ANOVA unidirecional seguida pelo teste de Bonferroni.

3.8 ANCORAGEM MOLECULAR

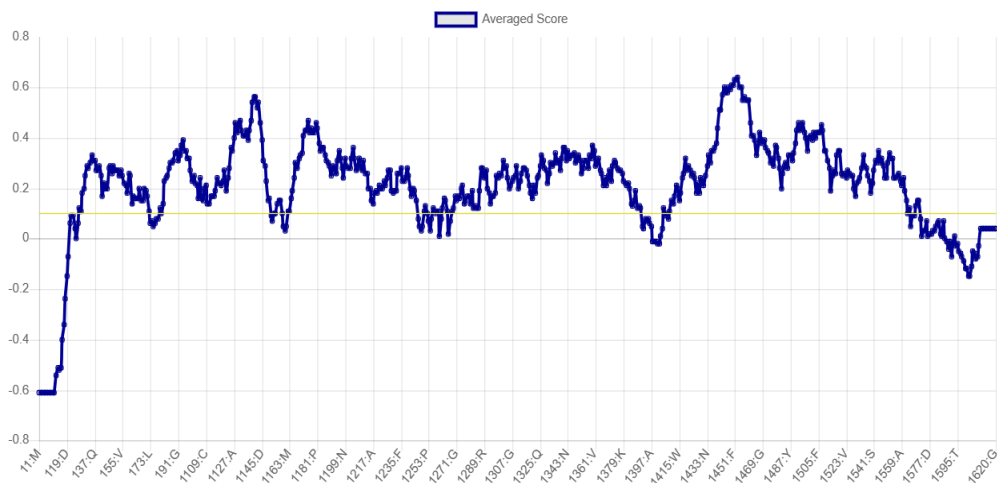
A Figura 18 mostra a estrutura AChE de *C. elegans* obtida de AlphaFold e seu sítio de ligação. O Verify3D apresentou score S superior a 0,1 a 81,13% dos aminoácidos protéicos, onde os resíduos de 1 a 26 são as regiões com menor score (Figura 19). Verify3D indica que proteínas com avaliação de geometria compatível in vitro têm pelo menos 80%, consistente com a estrutura AChE de AlphaFold *C. elegans* (BOWIE et al., 1991 ; LÜTHY et al., 1992). Além disso, a região com a pontuação S mais baixa não está dentro dos locais de ligação onde o OEBU foi encaixada. Assim isso não prejudicará esta análise.

Figura 18. Estrutura AChE de *C. elegans* obtida de AlphaFold (AF-P38433-F1).



Fonte: AlphaFold (AF-P38433-F1): O local de ligação está destacado em vermelho. A região proteica com os escores S mais baixos é destacada em amarelo.

Figura 19. Verificação dos resultados da validação 3D



Fonte autor: Verificação dos resultados da validação 3D. Cada resíduo proteico recebe um valor de pontuação S que, quando energeticamente estável em sua conformação, deve ser $> 0,1$. 81,13% deste modelo AChE de *C. elegans* corresponde a este valor de corte.

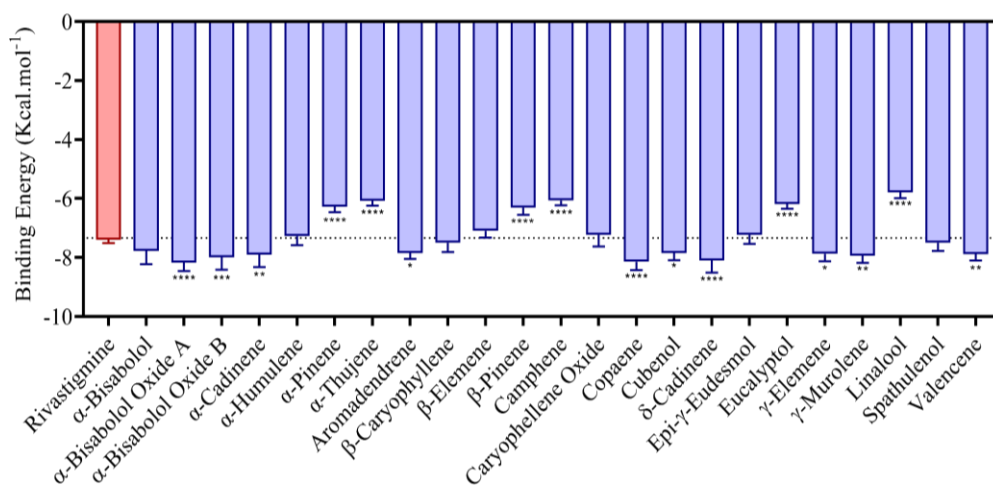
A análise MolProbity resultou em um escore Z de distribuição gama de $-0,36 \pm 0,32$ e a plotagem ramachandran onde 100% dos resíduos estavam dentro das regiões permitidas. As estruturas validadas geometricamente possuem estes parâmetros: $-2 > \text{escore Z} > 2$, e pelo menos 99,8% dos resíduos estão dentro das regiões permitidas, o que também é compatível

com *C. elegans* AChE do AlphaFold (LOVELL et al., 2003).

A Figura 20 exibe o gráfico das energias de ligação das OEBUs ao *C. elegans* AChE. óxido de α -bisabolol A ($-8,18 \pm 0,28$ kcal/mol), copaeno ($-8,14 \pm 0,28$ kcal/mol), δ -cadineno ($-8,10 \pm 0,41$ kcal/mol), óxido de α -bisabolol B ($-7,99 \pm 0,43$ kcal /mol), γ -muroleno ($-7,94 \pm 0,24$ kcal/mol), α -cadineno ($-7,90 \pm 0,42$ kcal/mol), valenceno ($-7,89 \pm 0,21$ kcal/mol), γ -elemeno ($-7,88 \pm 0,25$ kcal /mol), aromadendreno ($-7,86 \pm 0,19$ kcal/mol) e cubenol ($-7,84 \pm 0,25$ kcal/mol) foram OEBUs com energias de ligação mais baixas estatisticamente significativas (valor de $p > 0,05$) do que a rivastigmina ($-7,4 \pm 0,11$ kcal/mol). mol). Por outro lado, β -pineno ($-6,31 \pm 0,24$ kcal/mol), α -pineno ($-6,28 \pm 0,19$ kcal/mol), eucaliptol ($-6,19 \pm 0,15$ kcal/mol), α -tujeno ($-6,08 \pm 0,16$ kcal/mol), canfeno ($-6,07 \pm 0,17$ kcal/mol) e linalol ($-5,79 \pm 0,20$ kcal/mol) foram OEBUs com energias de ligação mais altas estatisticamente significativas (valor de $p > 0,05$) do que a rivastigmina. α -Bisabolol ($-7,78 \pm 0,44$ kcal/mol), β -cariofileno ($-7,50 \pm 0,32$ kcal/mol), espatulenol ($-7,50 \pm 0,27$ kcal/mol), α -humuleno ($-7,28 \pm 0,31$ kcal/mol), óxido de cariofeleno ($-7,23 \pm 0,39$ kcal/mol), epi- γ -eudesmol ($-7,23 \pm 0,30$ kcal/mol) e β -elemeno ($-7,10 \pm 0,22$ kcal/mol) não apresentaram diferença significativa em relação à rivastigmina.

Os resultados das energias de ligação mostrados como energia livre de Gibbs correspondem à força de ligação e estabilidade dos ligantes. Um valor de energia livre de Gibbs mais baixo (mais negativo) indica uma ligação mais forte e maior estabilidade do ligante. Os componentes do OEBU com energias de ligação maiores ou equivalentes à rivastigmina são justamente aqueles que compõem a maior parte do óleo. Isto mostra-nos que, em geral, o OEBU tem como alvo a AChE para interação.

Figura 20. Resultados da energia de ligação de AChE de *C. elegans* e OEBU (kcal/mol).



Fonte Autor: Inibidor de AChE de *C. elegans*, a energia de ligação foi de $-7,4 \pm 0,11$ kcal/mol. Os dados foram analisados por meio de ANOVA unidirecional, onde * indica valor de $p < 0,05$, ** valor de $p < 0,005$, *** valor de $p < 0,0005$ e **** valor de $p < 0,0001$.

A Figura 21 mostra o perfil de ligação da rivastigmina (controle positivo), α -bisabolol (o principal componente da OEBU) e óxido de α -bisabolol A (componente da OEBU com a energia de ligação mais alta) à AChE de *C. elegans*. TRP138, TYR349 e PHE350 são resíduos que interagem com todos esses ligantes selecionados. Além disso, os tipos de interações (ligações de hidrogênio, π -sigma, alquila, van der Waals, ligações carbono-hidrogênio e π - π em forma de T) formadas são diversificadas e demonstram ligação mais eficiente.

Figura 21. Perfil de interação AChE *C. elegans* com rivastigmina, α -bisabolol e óxido de α -bisabolol A.

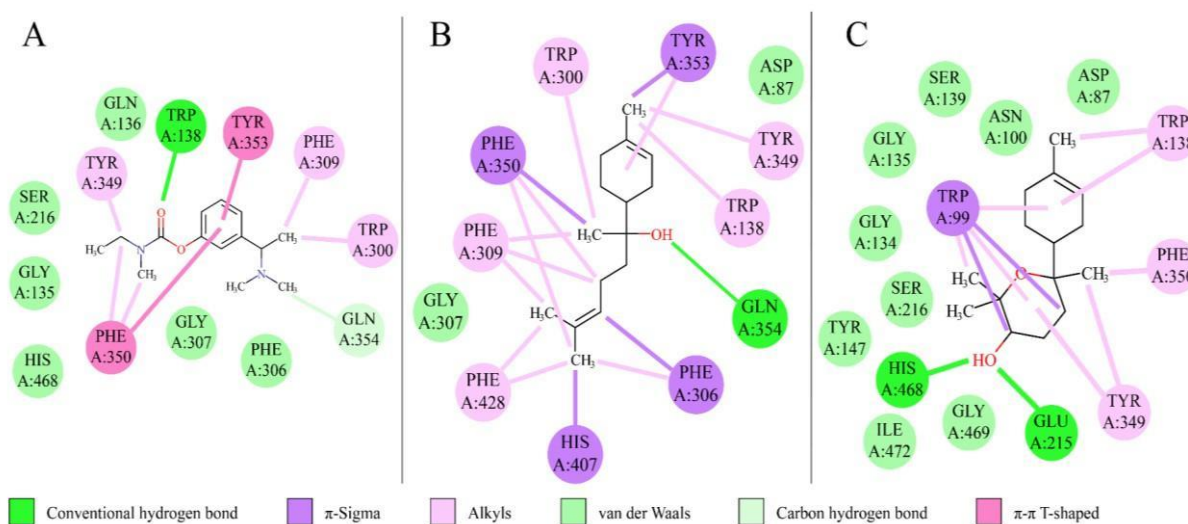


Figura 21: A rivastigmina interage com GLY135, GLN136, TRP138, SER216, TRP300, PHE306, PHE309, GLY307, TYR349, PHE350, TYR353, GLN354, HIS468. α -Bisabolol interage com ASP87, TRP138, TRP300, PHE306, GLY307, PHE309, TYR349, PHE350, TYR353, GLN354, HIS407 e PHE428. O óxido de α -bisabolol A interage com ASP87, ASN100, GLY134, GLY135, TRP138, SER139, TYR147, GLU215, SER139, SER216, TYR349, PHE350, HIS468, GLY469 e ILE472.

4 CONCLUSÃO

Os resultados deste trabalho mostraram que OEBU agiu como um inibidor da enzima AChE, nas menores concentrações tanto nos ensaios *in vitro* como *in vivo*, mostrando também que o OEBU tem a capacidade de ser formulado em escala nanométrica podendo ser utilizado no tratamento da doença de Alzheimer, porém mais estudos deverão ser aprimorados em virtude de avaliar os efeitos do OEBU no tamanho *C. elegans* aqui observados.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A Caracterização do óleo essencial da espécie *Bauhinia unguolata*, mostrou que havia predominância de compostos sesquiterpenos e o α -bisabolol foi o componente majoritário. Os ensaios *in silico* da ancoragem molecular foram empregadas para avaliar vários aspectos da interação entre o inibidor (óleo essencial) e a enzima acetilcolinesterase (AChE), o qual mostrou que as substâncias presentes no OEBU tiveram boas pontuações, especificamente, em comparação as drogas mais comuns aprovadas pela FDA para o tratamento do Alzheimer. Nos ensaios de inibição espectrofotométrica com AChE de enguia elétrica (enzima comercial), *in vitro*, o OEBU mostrou efeito inibidor pela diminuição significativa da atividade enzimática. Os resultados da titulação de RMN ^1H sugerem que o componente volátil majoritário α - bisabolol apresentou maior deslocamento químico.

Os ensaios para determinar a atividade antioxidante *in vitro* revelaram que o OEBU apresentou atividade antioxidante em todos os testes propostos neste trabalho.

O acoplamento molecular dos principais componentes do OEBU, com a Catalase humana (CATH) mostrou boas interações com esta enzima.

Os resultados deste trabalho mostraram que o OEBU agiu como um inibidor da enzima AChE, nas menores concentrações tanto nos ensaios *in vitro* como *in vivo*, revelando que este óleo essencial pode ser um potente fármaco no combate a doença de Alzheimer no entanto mais estudos deverão ser aprimorados.

REFERÊNCIAS

- ALMELDA, C. J.; ALMEIDA, P. P.; GHERARDI, M. R. S. Potencial antimicrobiano de óleos essenciais: uma revisão de literatura de 2005 a 2018. *Nutritime Revista Eletrônica*, v. 17, n.1, 2020.
- ALEXANDER, A. G.; MARFIL, V.; LI, Chris. Use of *Caenorhabditis elegans* as a model to study Alzheimer's disease and other neurodegenerative diseases. *Frontiers in genetics*, v. 5, [s. n.], p. 95895, 2014.
- BAZANA, M. T.; da SILVA, S. S.; CODEVILLA, C. F.; de DEUS, C.; LUCAS, B. N.; UGALDE, G. A.; de MENEZES, C. R. Development of nanoemulsions containing *Physalis peruviana* calyx extract: A study on stability and antioxidant capacity. *Food research international*, v. 125, [s. n.], p. 108645, 2019.
- BOWIE, J. U.; LÜTHY, R.; EISENBERG, D. A method to identify protein sequences that fold into a known three-dimensional structure. *Science*, v. 253, n. 5016, p. 164-170, 1991.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.
- CALAHORRO, F.; HOLDEN-DYE, L.; O'CONNOR, V. Impact of drug solvents on *C. elegans* pharyngeal pumping. *Toxicology Reports*, v. 8, [s. n.], p. 1240-1247, 2021.
- CORSI, K. A.; WIGHTMAN, B.; CHALFIE, M. A. Transparent window into biology: A primer on *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, v. 200, [s. n.], p.387-407, 2015.
- CHARÃO, M. F.; GARCIA, S. C. Avaliação toxicológica de nanocápsulas de núcleo lipídico e estudo da eficiência de nanocápsulas contendo melatonina na proteção frente ao dano causado pelo paraquat. Tese de (doutorado) Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Universidade Federal do Rio Grande do Sul Faculdade de Farmácia. RS. Porto Alegre, 2015.
- DIGHE, S. N.; De la MORA, E.; CHAN, S.; KANTHAM, S.; McCOLL, G.; *et al.*; Rivastigmine and metabolite analogues with putative Alzheimer's disease-modifying properties in a *Caenorhabditis elegans* model. *Communications Chemistry*, v. 2, n. 1, p. 35, 2019.
- FERRARI, C.; SALLE, R.; CALLEMEYN-TORRE, N.; JOVELIN, R.; CUTTER, A. D.; *et al.*; Ephemeral-habitat colonization and neotropical species richness of *Caenorhabditis nematodes*. *Bmc Ecology*, v. 17, [s. n.], p. 1-13, 2017.
- GOH, K, M.; HONG, X. Y.; NYAM, K. L. Influence of homogenization cycle on the thermal and storage stability of kenaf seed oil (KSO) emulsion. *Journal of Food Measurement and Characterization*, v. 15, n. 4, p. 3307-3313, 2021.
- GUBERT, P.; AGUIAR, G. C.; MOURÃO, T.; BRIDI, J. C.; BARROS, A. G.; SOARES, F. A.; *et al.*; Behavioral and metabolic effects of the atypical antipsychotic ziprasidone on the nematode *Caenorhabditis elegans*. *PLoS One*, v. 8, n. 9, p. 74780, 2013.
- HE, S.; JACOBSEN, J.; NIELSEN, C. U.; GENINA, N.; ØSTERGAARD, J.; MU, H. Exploration of in vitro drug release testing methods for saquinavir microenvironmental pH modifying buccal films. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 163, [s. n.], p.

105867, 2021.

HUANG, C. W.; LIAO, W. R.; HOW, C. M.; YEN, P. L.; WEI, C. C. (2021). Chronic exposure of zearalenone inhibits antioxidant defense and results in aging-related defects associated with DAF-16/FOXO in *Caenorhabditis elegans*. *Environmental Pollution*, v. 285, [s. n.], p. 117233, 2021.

HOU Y., DAN X., BABBAR M., et al. Aging as a risk factor for neurodegenerative diseases. *Nat. Rev.* V.15, 2019.

HOU, Y.; DAN, X.; BABBAR, M.; WEI, Y., HASSELBALCH, S. G.; *et al.*; Ageing as a risk factor for neurodegenerative disease. *Nature Reviews Neurology*, v. 15, n. 10, p. 565-581, 2019.

HARADA, S.; HASHIZUME, T.; NEMOTO, K.; SHAO, Z.; HIGASHITANI, N.; *et al.*; Fluid dynamics alter *Caenorhabditis elegans* body length via TGF- β /DBL-1 neuromuscular signaling. *npj Microgravity*, v. 2, n. 1, p. 1-7, 2016.

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

JUMPER, J.; EVANS, R.; PRITZEL, A.; GREEN, T.; FIGURNOV, M.; *et al.*; Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature*, v. 596, n. 7873, p. 583-589, 2021.

JIANG, J.; SU, Y.; ZHANG, R.; LI, H.; TAO, L.; *et al.*; *C. elegans* enteric motor neurons fire synchronized action potentials underlying the defecation motor program. *Nature communications*, v. 13, n. 1, p. 2783, 2022.

LEITE, N. R. Composição química e efeitos de frutos do Cerrado sobre o estresse oxidativo, longevidade e doença de Alzheimer em *Caenorhabditis elegans*. Tese de (Mestrado) Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde- Universidade Federal da Grande Dourados, Faculdade de Ciências da Saúde, Grande Dourados, MS, 2018.

LI, Y.; ZHONG, L.; ZHANG, L.; SHEN, X.; KONG, L.; *et al.*; Research advances on the adverse effects of nanomaterials in a model organism, *Caenorhabditis elegans*. *Environmental toxicology and chemistry*, v. 40, n. 9, p. 2406-2424, 2021.

LÜTHY, R.; BOWIE, J. U.; EISENBERG, D. Assessment of protein models with three-dimensional profiles. *Nature*, v. 356, n. 6364, p. 83-85, 1992.

MEDEIROS, A.N.R.S., et al. Fitodisponibilidade de metais, composição química e ensaios biológicos no óleo de *Bauhinia unguolata* L. (FABACEAE). *Journal of Medicinal Plants Research* 2016.

MOHAMMAD, T.; MATHUR, Y.; HASSAN, M. I. InstaDock: A single-click graphical user interface for molecular docking-based virtual high-throughput screening. *Briefings in Bioinformatics*, v. 22, n. 4, p. 279, 2021.

PAIVA, Franciny Aparecida. Baccharis trimera protege contra o estresse oxidativo e toxicidade induzida pelo peptídeo β -amilóide no *Caenorhabditis elegans*. 2015. Tese de (Doutorado) Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas – Universidade Federal de Ouro Preto, Instituto de Ciências Exatas e Biológicas, Ouro Preto, MG, 2015.

- RACZ, P. I.; WILDWATER, M.; ROOSEBOOM, M.; KERKHOF, E.; PIETERS, R.; *et al.*; Application of *Caenorhabditis elegans* (nematode) and Danio rerio embryo (zebrafish) as model systems to screen for developmental and reproductive toxicity of Piperazine compounds. *Toxicology in Vitro*. v. 44, [s. n.], p.11-16. 2017.
- SEDMAN, J. J.; GROSSBERG, S. E. A rapid, sensitive, and versatile assay for protein using Coomassie brilliant blue G250. *Analytical biochemistry*, v. 79, n. 1-2, p. 544-552, 1977.
- STIERNAGLE, Theresa. "Maintenance of *C. elegans*. WormBook. The *C. elegans* research community." *WormBook*, [S.l.: s.n.], (2006).
- SANTOS, K.M.; GONÇALVES, P.S.; PAIVA, M.J.N.; LACERDA, G.A. Acetylcholinesterase Inhibition from Startin extracts of Bauhinia variegata L, Bauhinia Var. Candida (Aiton) Buch – ham and Bauhinia unguolata L. *Revista Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 44, 6, p.741-783, 2011.
- SOUZA, L. M.; de CARVALHO, J. L.; da SILVA, H. C.; LEMOS, T. L.; ARRIAGA, A. M.; FILHO, R. B.; SANTIGO, G. M. New cytotoxic bibenzyl and other constituents from *Bauhinia unguolata* L.(Fabaceae). *Chemistry & Biodiversity*, v. 13, n. 12, p. 1630-1635, 2016.
- SOUZA, S. P. D.; VALVERDE, S. S.; SILVA, R. L.; LIMA, K. D. S. C.; LIMA, A. L. D. S. Óleos essenciais como inibidores da acetilcolinesterase. *Revista Fitos*, v. 7, n. 04, 2012.
- SOUZA, A. J. S.; OCAMPOS, F. M. M.; PULGROSSI, R. C.; DOKKEDAL, A. L.; COLNAGO, L. A.; CECHIN, I.; SALDANHA, L. L. NMR-based metabolomics reveals effects of water stress in the primary and specialized metabolisms of *Bauhinia unguolata* L. (Fabaceae). *Metabolites*, v. 13, n. 3, p. 381, 2023.
- SOUSA, F. L.; SANTOS, M.; ROCHA, S. M.; TRINDADE, T. Encapsulation of essential oils in SiO₂ microcapsules and release behaviour of volatile compounds. *Journal of microencapsulation*, v. 31, n. 7, p. 627-635, 2014.
- TISSENBAUM, H.A. Usando o *C. elegans* para pesquisa de envelhecimento. *Invertebr. Reproduzir*, n.59, [s. n.], p. 59-63, 2015.
- ULLAH, N.; AMIN, A.; ALAMOUDI, R. A.; RASHEED, S. A.; ALAMOUDI, R. A.; NAWAZ, A.; ABBAS, S. S. Fabrication and optimization of essential-oil-loaded nanoemulsion using Box–Behnken design against *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* isolated from oral cavity. *Pharmaceutics*, v. 14, n. 8, p. 1640, 2022.
- VARADI, M.; ANYANGO, S.; DESHPANDE, M.; NAIR, S.; NATASSIA, C.; *et al.*; AlphaFold Protein Structure Database: Massively expanding the structural coverage of protein- sequence space with high-accuracy models. *Nucleic acids research*, v. 50, [s. n.], p. 439-444, 2022.
- VIEIRA, G. D. D.; ALVES, T. D. C.; YAMAGISHI, A. Y.; VIEIRA, N. N.; TELES, C. B. G. A deposição do peptídeo beta - amiloide e as alterações vasculares presentes na doença de Alzheimer. *J. Health. Biol. Sci.* v. 2, n. 4, p. 218-223, 2014.
- WANG, M. C.; O'ROURKE, E. J.; RUVKUN, G. Fat metabolism links germline stem cells and longevity in *C. elegans*. *Science*, v. 322, n. 5903, p. 957-960, 2008.
- WILLIAMS, C. J.; HEADD, J. J.; MORIARTY, N. W.; PRISANT, M. G.; VIDEAU, L. L.; *et al.*; MolProbity: More and better reference data for improved all-atom structure validation.

Protein Science, v. 27, n. 1, p. 293-315, 2018.

YUEN, C. W.; MURUGAIYAH, V.; NAJIMUDIN, N.; AZZAM, G.; *et al.* Danshen (*Salvia miltiorrhiza*) water extract shows potential neuroprotective effects in *Caenorhabditis elegans*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 266, [s. n.], p. 113418, 2021.

ZHANG, W.; LI, W.; LI, J.; CHANG, X.; NIU, S.; *et al.*; Neurobehavior and neuron damage following prolonged exposure of silver nanoparticles with/without polyvinylpyrrolidone coating in *Caenorhabditis elegans*. **Journal of Applied Toxicology**, v. 41, n. 12, p. 2055-2067, 2021.

ZHU, A.; ZHENG, F.; ZHANG, W.; LI, L.; LI, Y.; *et al.*; Oxidation and antioxidation of natural products in the model organism *Caenorhabditis elegans*. **Antioxidants**, v.11, n. 4, p.705,2022.

ANEXOS

Artigos Publicados

1 - In Vitro and In Silico Antioxidant Activity and Molecular Characterization of *Bauhinia unguolata* L. Essential Oil.

doi.org/10.1002/cbdv.202301536

Research Article



www.cb.wiley.com

In Vitro and In Silico Antioxidant Activity and Molecular Characterization of *Bauhinia unguolata* L. Essential Oil

Sandra Regina Nunes de Andrade Medeiros,^[a, b] Iverson Conrado Bezerra,^[b] Artur José da Silva,^[b] Lucas Aleixo Leal Pedroza,^[b] Regildo Max Gomes Martins,^[c] Ana Maria Henrique Moniz,^[a] Ana Cristina Gonçalves Reis de Melo,^[d] Wesley Souza Paiva,^[e] Priscila Gubert,^[b, f] and Antonio Alves de Melo Filho^{*,[a, d, g]}

Bauhinia unguolata is an antioxidant medicinal plant that has been manipulated in Brazil to lower glycemic index as well is for alternative treatment for diabetes. Therefore, the present hearch has aimed to investigate the antioxidant effects of the essential oil of *Bauhinia unguolata* L. (EOBU) collected in Amazon region better specified in Boa Vista, Roraima, Brazil, located in the Amazon region. Gas chromatography had been used to characterize the components, and antioxidant assays such as DPPH, TAC, reducing power, Fe²⁺ chelation, and total phenols had also been performed. The major constituents had molecularly anchored with the human catalase (CAT) enzyme, and maltol has showed as a positive control. Among the 25 revealed components, the main ones have been α -bisabolol (27.2%), β -Caryophyllene (12.5%) and Epi- γ -eudesmol (13.6%). The EOBU

has comproved a TAC value of 618.79 mg of ascorbic acid equivalent, free radical scavenging capacity (DPPH) around 53.7% and 65.27%, Fe²⁺ chelation capacity of 161 \pm 6 and 126.7 \pm 39.6, for 0.1 mg.mL⁻¹ and 0.5 mg.mL⁻¹, respectively. The power around the EOBU has appeared percentages equals to 28.66%, 44.6%, and 77.03% in the concentrations tested. As well as, 96.5% of total phenols. The compounds α -bisabolol (-5.7 ± 0.4 Kcal.mol⁻¹) and β -caryophyllene (-6.1 ± 0.5 Kcal.mol⁻¹) have showed good interaction with CAT compared to Maltol (-4.4 ± 0.4 Kcal.mol⁻¹). The present work has demonstrated that EOBU functions as a potent antioxidant, capable of scavenging free radicals and reducing oxidative stress damage.

Introduction

Reactive oxygen species (ROS), such as singlet oxygen (O₂), hydroxyl radical (OH[•]), superoxide anion (O₂⁻), and hydrogen peroxide (H₂O₂), as well as reactive nitrogen species (RNS), including nitric oxide (NO), nitrogen dioxide (NO₂), dinitrogen trioxide (N₂O₃), nitroxyl anion (NO⁻), nitroxyl cation (NO⁺), and peroxyxynitrite (ONOO⁻), are products of biological reactions or

exogenous factors.^[1] The disproportionate production of ROS/RNS compared to the capacities of the antioxidant system can lead to elevated levels of free radicals. These harmful molecules can damage crucial biological components such as DNA, proteins, lipids, and sugars, negatively impacting cell and tissue health, often leading to neurodegenerative and cardiovascular diseases.^[2,3]

It is possible on many situations, those damages can still be reversible and prevented, primarily through antioxidant mechanisms such as the action of natural antioxidants like vitamin C or through enzymes such as Catalase (CAT), responsible for converting H₂O₂ into O₂ and H₂O, superoxide dismutase (SOD), and glutathione peroxidase (GPx). The malfunctioning of these enzymes is often associated with the development and progression of chronic diseases such as Alzheimer's, Parkinson's, and cancer.^[4,5,6]

Having this thought in mind, natural products and molecules have emerged in recent years as potential protagonists in preventing and protecting against reactive species originating from cellular oxidative stress, especially due to their antioxidant properties.^[7,8] Among these natural products, essential oils have been gained increasing attention in research groups due to their low toxicity and hydrophobic nature, properties that allow for greater bioavailability and better absorption compared to other extracts. Many of them are already documented in the literature as potent antioxidants, such as citronella (*Cymbopogon nardus*),^[9] cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*),^[10,11] ginger (*Zingiber officinale*),^[12] and basil (*Origanum majorana*).

[a] Prof. S. R. Nunes de Andrade Medeiros, Prof. A. M. H. Moniz, Dr. A. Alves de Melo Filho
Biodiversity and Biotechnology of the Legal Amazon, PPG Bionorte, Federal University of Roraima (UFRR), Boa Vista, RR, Brazil
E-mail: antonio.alves@ufrr.br

[b] Prof. S. R. Nunes de Andrade Medeiros, Prof. I. Conrado Bezerra, A. José da Silva, L. A. Leal Pedroza, P. Gubert
Neizo Asami Institute, Federal University of Pernambuco (UFPE), Recife, PE, Brazil

[c] Dr. R. M. Gomes Martins
Biotechnology Multi-institutional Program, PPGBIOTEC, Federal University of Amazonas (UFAM), Manaus, Amazonas, Brazil

[d] A. C. Gonçalves Reis de Melo, Dr. A. Alves de Melo Filho
Environmental Chemistry Laboratory, Center for Research and Graduate Studies in Science and Technology, Federal University of Roraima (UFRR), Boa Vista, RR, Brazil

[e] Dr. W. Souza Paiva
Post-Graduate Program in Biochemistry and Molecular Biology, Federal University of Rio Grande do Norte, Natal, Brazil

[f] P. Gubert
Post-Graduate Program in Biology Applied in Health, Federal University of Pernambuco, Recife, PE, Brazil

2 – Evaluation of *Bauhinia unguolata* essential oil as a new acetylcholinesterase inhibitor from an in silico and in vitro perspective in the Northern Amazon of Brazil.

Journal of Oleo Science



Evaluation of *Bauhinia unguolata* essential oil as a new acetylcholinesterase inhibitor from an in silico and in vitro perspective in the Northern Amazon of Brazil

Journal:	<i>Journal of Oleo Science</i>
Manuscript ID	ESS-23-148.R1
Manuscript Type:	Regular Paper
Date Submitted by the Author:	29-Feb-2024
Complete List of Authors:	Medeiros, Sandra Regina; Federal University of Roraima, PPG Bionorte Bezerra, Iverson; Federal University of Pernambuco, Keizo Asami Institute Pedroza, Lucas Aleixo; Federal University of Pernambuco, Keizo Asami Institute Martins, Regildo Max; Federal University of Amazonas, PPGBIOTEC da Silva, Artur; Federal University of Pernambuco, Keizo Asami Institute Menezes, Thaís; Federal Rural University of Pernambuco, Engineering Campus - Academic Unit of Cabo de Santo Agostinho Reis de Melo, Ana Cristina; Federal University of Roraima, Environmental Chemistry Laboratory, Center for Research and Postgraduate in Science and Technology Neves, Jorge; Federal University of Pernambuco, Biological Chemistry Laboratory, Department of Fundamental Chemistry Gubert, Priscila; Federal University of Pernambuco, Keizo Asami Institute de Melo Filho, Antonio; Federal University of Roraima, Chemistry
Keywords:	α -Bisabolol, alzheimer, essential oil, acetylcholinesterase inhibitors
Categories:	Essential Oils & Natural Products, Biochemistry & Biotechnology

SCHOLARONE™
Manuscripts