

UNIVERSIDADE TIRADENTES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E AMBIENTE

**EFEITO NEUROPROTETOR DO TRATAMENTO INTRANASAL
COM NANOPARTÍCULAS DE SÍLICA VEICULADORAS DE
BIOCOMPOSTOS DA *Tradescantia spathacea* EM MODELO
PRÉ-CLÍNICO DA DOENÇA DE PARKINSON**

LORENNNA EMÍLIA SENA LOPES

Aracaju
Janeiro – 2024

UNIVERSIDADE TIRADENTES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E AMBIENTE

**EFEITO NEUROPROTETOR DO TRATAMENTO INTRANASAL
COM NANOPARTÍCULAS DE SÍLICA VEICULADORAS DE
BIOCOMPOSTOS DA *Tradescantia spathacea* EM MODELO
PRÉ-CLÍNICO DA DOENÇA DE PARKINSON**

Tese de doutorado submetida à banca
examinadora para a obtenção do título de Doutora
em Saúde e Ambiente, na área de concentração
Saúde e Ambiente.

LORENNNA EMÍLIA SENA LOPES

Orientadora
Professora Doutora Margarete Zanardo Gomes

Co-orientador
Doutor Klebson Silva Santos

Aracaju
Janeiro – 2024

L864e Lopes, Loreнна Emília Sena
Efeito neuroprotetor do tratamento intranasal com nanopartículas de sílica veiculadoras de biocompostos da *Tradescantia spathacea* em modelo pré-clínico da doença de Parkinson / Loreнна Emília Sena Lopes; orientação [de] Prof.^a Dr. ^a Margarete Zanardo Gomes, Prof. Dr. Klebson Silva Santos – Aracaju/ SE: UNIT, 2024.

81 f.il; 30 cm

Tese (Doutorado em Saúde e Ambiente) – Universidade Tiradentes 2024

1.Administração intranasal 2. Commelinaceae 3. Doença de Parkinson 4. Polifenóis 5. Sistemas de liberação de fármacos por nanopartículas I. Lopes, Loreнна Emilia Sena II. Gomes, Margarete Zanardo (orient.). III. Santos, Klebson Silva (orient.). IV. Universidade Tiradentes. V. Título.

CDU: 616.858

Gislene Maria S. Dias CRB-5/1410

**EFEITO NEUROPROTETOR DO TRATAMENTO INTRANASAL COM NANOPARTÍCULAS
DE SÍLICA VEICULADORAS DE BIOCOMPOSTOS DA *Tradescantia spathacea* EM
MODELO PRÉ-CLÍNICO DA DOENÇA DE PARKINSON**

Lorennia Emília Sena Lopes

TESE DE DOUTORADO SUBMETIDA À BANCA EXAMINADORA PARA A OBTENÇÃO DO
TÍTULO DE DOUTOR EM SAÚDE E AMBIENTE, NA ÁREA DE
CONCENTRAÇÃO SAÚDE E AMBIENTE

Aprovada por:

Documento assinado digitalmente
 **MARGARETE ZANARDO GOMES**
Data: 26/03/2024 09:58:34-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Margarete Zanardo Gomes, D.Sc.
Orientadora

Documento assinado digitalmente
 **KLEBSON SILVA SANTOS**
Data: 25/03/2024 12:27:47-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Klebson Silva Santos, D.Sc.
Co-orientador

Documento assinado digitalmente
 **JULIANA CORDEIRO CARDOSO**
Data: 25/03/2024 15:47:43-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Juliana Cordeiro Cardoso, D.Sc.
Universidade Tiradentes - Examinador

Documento assinado digitalmente
 **MARIA NOGUEIRA MARQUES**
Data: 26/03/2024 11:08:06-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Maria Nogueira Marques, D.Sc.
Universidade Tiradentes - Examinador



Documento assinado digitalmente
Ricardo Luiz Cavalcanti de Albuquerque Júnior
Data: 25/03/2024 11:52:07-0300
CPF: ***.876.344-**
Verifique as assinaturas em <https://v.ufsc.br>

Ricardo Luiz Cavalcanti de Albuquerque Júnior, D.Sc.
Universidade Federal de Santa Catarina - Examinador

Documento assinado digitalmente
 **JULIANA FACCIN DE CONTO BORGES**
Data: 25/03/2024 14:12:55-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Juliana Faccin de Conto Borges, D.Sc.
Universidade Tiradentes - Examinador

Dedico àqueles que acreditam nos seus sonhos.

“Porque dEle, por Ele e para Ele são todas as coisas!”

Romanos 11:36

AGRADECIMENTOS

Sou grata à Deus pelos lindos planos em minha vida, por me permitir sonhar e por me dar oportunidades para concretizá-los. À Santa Bárbara por me dar forças para prosseguir mesmo nos dias mais turbulentos. Sem dúvidas, a espiritualidade me sustentou e me conduziu até aqui.

Aos meus pais, Ana Sena e Mauro Lopes, por colocarem meus estudos como prioridade desde a infância, por me apoiarem e entenderem as minhas abdicções. Essa conquista é nossa! Às minhas estrelas-guias: “meu voinho” Sena (*in memoriam*) por ter sido motivo da minha luta nesta pesquisa, e meu tio Marcelo (*in memoriam*) por ter me ensinado que eu poderia chegar onde eu quisesse se eu persistisse.

À minha orientadora Dr.^a Margarete Zanardo por ser uma referência para mim, que me guiou e foi responsável por grande parte do meu desenvolvimento científico. Ao meu co-orientador Klebson Silva por me apresentar um “mundo novo”, pela paciência e por confiar em mim nas muitas vezes que eu achei que não daria conta.

Aos meus amigos de pesquisa e de vida, Ana Maria Gomes e Reinaldo Viana, por não soltarem minha mão em momento algum. Às minhas “crias científicas” (meus ex-alunos de iniciação científica), Danielle Lima, Carolina Leite e Rafael Guimarães, agradeço pelo incrível comprometimento. Aos amigos, Tatiane Batista e Rafael Valois, sou grata por tanto auxílio e carinho. Todos vocês foram essenciais nessa jornada!

Ao Prof. Dr. Ricardo Albuquerque pelos ensinamentos, sábias palavras e bons momentos em laboratório. À Prof. Dr.^a Juliana Cordeiro pela parceria e por ser inspiração para mim. À Dr.^a Rose Nely e colegas de LMPE, gratidão pela convivência e por me ajudarem nesse complexo quebra-cabeças. Cada um foi peça fundamental para essa conquista! Aos membros no NUESC, em especial Prof. Dr. Claudio Dariva, pela parceria e oportunidade de expandir esta pesquisa.

Aos animais utilizados para o desenvolvimento do experimento, todo meu respeito e gratidão. À Júlio por me ensinar sobre técnicas e respeito aos animais, pela paciência e suporte. À Carlos e Marcos pelos inúmeros auxílios e disponibilidade.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo financiamento.

SUMÁRIO

LISTA DE SIGLAS E ABREVIações	ix
LISTA DE FIGURAS	xi
LISTA DE QUADROS	xv
LISTA DE TABELAS.....	xvi
RESUMO	17
ABSTRACT	18
1 INTRODUÇÃO	19
2 OBJETIVOS.....	21
2.1 Objetivo geral	21
2.2. Objetivos específicos	21
3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	22
3.1 Núcleos da base.....	22
3.2 Doença de Parkinson.....	23
3.2.1 Fisiopatologia	23
3.2.2 Manifestações clínicas.....	25
3.2.3 Modelos experimentais da doença de Parkinson.....	26
3.2.4 Medidas terapêuticas.....	29
3.3 Produtos naturais e compostos bioativos.....	30
3.4 <i>Tradescantia spathacea</i>	31
3.5 Nanopartículas de sílica	34
3.6 Nanopartículas de sílica em <i>drug delivery systems</i>	35
4 MATERIAL E MÉTODOS	37
4.1 Local da pesquisa	37
4.2 Material vegetal	37
4.3 Extração	37
4.4 Caracterização do EATS	38
4.4.1 Determinação de rendimento global.....	38
4.4.2 Quantificação de ácidos fenólicos	38
4.4.3 Quantificação de flavonoides totais.....	38
4.5 Obtenção de nanopartículas	39
4.6 Caracterização das nanopartículas	40
4.6.1 Morfologia	40
4.6.2 Termogravimetria	40
4.6.3 Calorimetria exploratória diferencial	40

4.6.4 Espectroscopia de infravermelho com Transformada de Fourier	41
4.7 Ensaio <i>in vivo</i>	41
4.7.1 Animais.....	41
4.7.2 Grupos experimentais.....	41
4.7.3 Procedimento cirúrgico	42
4.7.4. Avaliações funcionais	44
4.7.4.2 Teste do cilindro	44
4.7.5 Eutanásia e preparo histológico	45
4.7.6 Análise imunohistoquímica	46
4.7.7 Quantificação de células	46
4.7.8 Densidade óptica relativa para TH	47
4.8 Análise estatística	47
5 RESULTADOS	48
5.1 Caracterização do EATS	48
5.2 Caracterização das nanopartículas	48
5.2.1 Morfologia	48
5.2.2 Análise termogravimétrica.....	50
5.2.3 Calorimetria exploratória diferencial	51
5.2.4 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier	54
5.3 Análise comportamental	55
5.3.1 Teste de campo aberto.....	55
5.3.2 Teste de cilindro	59
5.4 Análise imunohistoquímica	60
5.4.1 Preservação de neurônios na SNc	60
5.4.2 Preservação de fibras estriatais	62
5.4.3 Expressão astrocitária no núcleo estriado.....	62
6 DISCUSSÃO	64
7 CONCLUSÃO	69
REFERÊNCIAS	70
ANEXO 1 – EXSICATA DA <i>Tradescantia spathacea</i>	78
ANEXO 2 – CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DA CEUA	79
ANEXO 3 – IDENTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS DO EATS	80

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATÖES

%R porcentagem de rendimento global
%TC porcentagem de toques contralaterais
6-OHDA 6-hidroxidopamina
AChE Acetilcolinesterase
AgE Ácido Gálico Equivalente
ANOVA Análise de Variância
AP Anteroposterior
CAT Catalase
CEUA Comissão de Ética no Uso de Animais
COMT Catecol-O-metiltransferase
CONCEA Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
COX-2 Ciclo-oxigenase-2
CPu Putâmen e Caudado
CTL Controle
D1 Receptor dopaminérgico tipo D1
D2 Receptor dopaminérgico tipo D2
DA Dopamina
DAB Tetracloreto de 3'3'-diaminobenzidina
DP Doença de Parkinson
DV Dorsoventral
DTG Derivada Termogravimétrica
EATS Extrato Aquoso de *Tradescantia spathacea*
ERO's Espécies Reativas de Oxigênio
FTIR Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier
GABA Ácido gama-aminobutírico
GFAP Proteína ácida fibrilar glial, do inglês *Glial fibrillary acidic protein*
GPe Globo Pálido Externo
GPi Globo Pálido Interno
GSH Glutathione
H₂O₂ Peróxido de hidrogênio
HCl cloreto de hidrogênio
IL-1 α Interleucina pró-inflamatória 1 α
IL-1 β Interleucina pró-inflamatória 1 β
IL-6 Interleucina pró-inflamatória 6
INF Infusão
iNOS Óxido nítrico-sintase induzida
ITP Instituto de Tecnologia e Pesquisa
L-DOPA Levodopa
LMPE Laboratório de Morfologia e Patologia Experimental
Mag Massa da amostra granulada
MAO Monoamina oxidase
ML Mediolateral
Mes Massa de extrato seco
MEV microscopia eletrônica de varredura
MPTP 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina
MSNs Nanopartículas de Sílica Mesoporosa

Na₂CO₃ Carbonato de Sódio
NB Núcleos da Base
NFκB Fator nuclear Kappa B
nNOS Sintase de Óxido Nítrico Neuronal
NP Nanopartículas
NPSiO₂ Nanopartículas de sílica
NPSiO₂-TS Nanopartículas de sílica veiculadoras de biocompostos da *Tradescantia spathacea*
NST Núcleo subtalâmico
NUESC Núcleo de Estudos em Sistemas Coloidais
PBS Tampão fosfato salino, do inglês *Phosphate buffered saline*
PE 10 Polietileno
Potencial redox Potencial oxidação-redução
SNpc Substância negra parte compacta
SNr Substância negra parte reticulata
SOD Superóxido dismutase
T. spathacea Tradescantia spathacea
TBS Solução salina tamponada, do inglês *Tris-buffered saline*
Tc Toques contralaterais
TEOS Tetraetoxisilano
TG Análise termogravimétrica
TH Tirosina-hidroxilase
Th Toques homolaterais
Ti Toques ipsilaterais
TNF-α Fator de necrose tumoral alfa
UNIT Universidade Tiradentes

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação gráfica de corte coronal do cérebro ilustrando os núcleos da base e o córtex. Adaptado de Wu et al. (2018).....	22
Figura 2: Modelo simplificado das vias direta e indireta dos núcleos da base, com esquema fisiológico e na doença de Parkinson. DA = Dopamina, D1 e D2 = Receptores D1 e D2, CPU = Putâmen e caudado, SNc e SNr = Substância negra parte compacta e reticulada; GPe e GPi = Globo pálido externo e interno, NST = núcleo subtalâmico. Adaptado de Metin e Şengör (2015).	23
Figura 3: Ilustração compara SNpc em situação fisiológica e na doença de Parkinson (DP), onde na SNpc de um indivíduo com DP pode ser observada redução de neurônios dopaminérgicos nos terminais pré e pós-sinápticos em relação a um indivíduo saudável, além da visualização de agregados de proteína α -sinucleína formando corpos de Levy. Adaptado de National Institute of Neurological Disorders and Stroke National Institutes of Health (2020).	24
Figura 4: Esquema representativo em forma de linha do tempo das manifestações clínicas da DP na fase prodrômica e fase clínica, onde pode ser observada a evolução dos sintomas motores e não motores de acordo com a severidade da patologia. Adaptado de Jankovic; Tan, 2020.	26
Figura 5: Estrutura química molecular da 6-hidroxidopamina e da dopamina. Adaptado de Zeng et al. (2018).	27
Figura 6: Ilustração sobre o mecanismo de ação da 6-hidroxidopamina (6-OHDA), onde após entrar no neurônio a toxina oxida-se e produz espécies reativas de oxigênio (ERO's), levando a disfunção mitocondrial e consequentemente apoptose do neurônio. Adaptado de Kaji et al., 2020.	27
Figura 7: Ilustração mostrando três parâmetros do teste de campo aberto. Fonte: Valvassori; Quevedo, 2017.	28
Figura 8: Ilustração de animal realizando o toque espontâneo com membro dianteiro ipsilateral durante o teste do cilindro. Fonte: Magno et al., (2019).	29
Figura 9: Fotografia da Tradescantia spathacea. Fonte: Arquivo pessoal (2020).....	32
Figura 10: Ilustração das propriedades físico-químicas ajustáveis das nanopartículas de sílica mesoporosa (MSNs). Adaptado de Rastegari et al., (2021).	34
Figura 11: Curva de calibração para solução padrão de ácido gálico.	38
Figura 12: Curva de calibração para solução padrão de rutina.	39
Figura 13: Aspecto das amostras de NPSiO ₂ (A) e NPSiO ₂ -TS (B). Arquivo pessoal (2022).	40
Figura 14: Corte coronal (A), sagital (B) e horizontal (C) do encéfalo com as coordenadas referidas (em vermelho). Adaptado de Paxinos et al. (2006).....	43

- Figura 15: Fotografia do equipamento de campo aberto utilizado, com animal realizando rearing. Arquivo pessoal. 44
- Figura 16: Fotografia do equipamento do teste do cilindro com animal realizando toque contralateral à lesão. Arquivo pessoal. 45
- Figura 17: Micrografias de extrato aquoso de *Tradescantia spathacea* (EATS), nanopartículas de sílica (NPSiO₂), e nanopartículas de sílica veiculadoras de biocompostos de *Tradescantia spathacea* (NPSiO₂-TS). 49
- Figura 18: Análise termogravimétrica da amostra de EATS. Expresso em porcentagem de massa perdida (%TG – linha contínua) e porcentagem da derivada por minuto (DTG %/min – linha tracejada). Onde EATS = Extrato aquoso de *Tradescantia spathacea*. 50
- Figura 19: Análise termogravimétrica da amostra de NPSiO₂ e NPSiO₂-TS. Expresso em porcentagem de massa perdida (%TG – linha contínua) e porcentagem da derivada por minuto (DTG %/min – linha tracejada). Onde NPSiO₂= nanopartículas de sílica; NPSiO₂-TS = nanopartículas de sílica veiculadoras de biocompostos de *Tradescantia spathacea*. 51
- Figura 20: Termograma de DSC da amostra EATS. Onde EATS = Extrato aquoso de *Tradescantia spathacea*. Expresso em fluxo de calor (W/g) de acordo com temperatura pré-estabelecida (°C). Linha em vermelho indica a entalpia de fusão (J/g). 52
- Figura 21: Termograma de DSC da amostra de nanopartículas de sílica (NPSiO₂). Expresso em fluxo de calor (W/g). Linha em vermelho indica a entalpia de fusão (J/g). 53
- Figura 22: Termograma de DSC da amostra de nanopartículas de sílica veiculadoras de biocompostos de *Tradescantia spathacea* (NPSiO₂-TS). Expresso em fluxo de calor (W/g). Linha em vermelho indica a entalpia de fusão (J/g). 53
- Figura 23: Espectro de FTIR da amostra EATS. Onde EATS = Extrato aquoso de *Tradescantia spathacea*. 54
- Figura 24: Espectros de FTIR das amostras de NPSiO₂ e NPSiO₂-TS. Onde NPSiO₂ = nanopartículas de sílica; NPSiO₂-TS = nanopartículas de sílica veiculadoras de biocompostos de *Tradescantia spathacea*. 55
- Figura 25: Resultado do teste de campo aberto quanto ao parâmetro de crossing, análise por ANOVA de uma via com pós teste de Tukey ($p < 0,05$). Onde CTL = controle; 6-OHDA = 6-hidroxidopamina; NPSiO₂-TS 10 = nanopartículas de sílica veiculadoras de biocompostos de *Tradescantia spathacea* 10 mg/kg; NPSiO₂-TS 30 = nanopartículas de sílica veiculadoras de biocompostos de *Tradescantia spathacea* 30 mg/kg. * significa diferença significativa em relação ao grupo CTL ($p < 0,05$), ## indica diferença significativa em relação ao grupo 6-OHDA ($p < 0,01$). 56
- Figura 26: Resultado do teste de campo aberto quanto ao parâmetro de rearing, análise por Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn ($p < 0,05$). Onde CTL = controle; 6-OHDA = 6-hidroxidopamina; NPSiO₂-TS 10 = nanopartículas de sílica veiculadoras de biocompostos de *Tradescantia spathacea* 10 mg/kg; NPSiO₂-TS 30 = nanopartículas de sílica veiculadoras de biocompostos de *Tradescantia spathacea* 30 mg/kg. ** indica diferença significativa em relação ao grupo CTL ($p < 0,01$). 57

Figura 27: Resultado do campo aberto, considerando os bolos fecais eliminados durante o teste, análise por Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn ($p < 0,05$). Onde CTL = controle; 6-OHDA = 6-hidroxidopamina; NPSiO₂-TS 10 = nanopartículas de sílica veiculadoras de biocompostos de Tradescantia spathacea 10 mg/kg; NPSiO₂-TS 30 = nanopartículas de sílica veiculadoras de biocompostos de Tradescantia spathacea 30 mg/kg. ** indica diferença significativa em relação ao grupo CTL ($p < 0,01$), # indica diferença significativa em relação ao grupo 6-OHDA ($p < 0,05$). 58

Figura 28: Resultado dos movimentos de grooming durante o teste, análise por Kruskal-Wallis com pós teste de Dunn ($p < 0,05$). Onde CTL = controle; 6-OHDA = 6-hidroxidopamina; Onde CTL = controle; 6-OHDA = 6-hidroxidopamina; NPSiO₂-TS 10 = nanopartículas de sílica veiculadoras de biocompostos de Tradescantia spathacea 10 mg/kg; NPSiO₂-TS 30 = nanopartículas de sílica veiculadoras de biocompostos de Tradescantia spathacea 30 mg/kg. 59

Figura 29: Resultado do teste de cilindro, expresso pela porcentagem de toques contralaterais, análise por Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn ($p < 0,05$). Onde CTL = controle; 6-OHDA = 6-hidroxidopamina; NPSiO₂-TS 10 = nanopartículas de sílica veiculadoras de biocompostos de Tradescantia spathacea 10 mg/kg; NPSiO₂-TS 30 = nanopartículas de sílica veiculadoras de biocompostos de Tradescantia spathacea 30 mg/kg. * indica diferença significativa em relação ao grupo CTL ($p < 0,05$). 60

Figura 30: Fotomicrografias (100x) de neurônios imunorreativos para enzima TH na SNc dos animais pertencentes aos grupos controle (A), 6-hidroxidopamina (6-OHDA) (B), nanopartículas de sílica veiculadoras de biocompostos de Tradescantia spathacea 10 mg/kg (NPSiO₂-TS 10) (C), nanopartículas de sílica veiculadoras de biocompostos de Tradescantia spathacea 30 mg/kg (NPSiO₂-TS 30) (D). 61

Figura 31: Resultado da quantificação de neurônios imunorreativos presentes em relação ao lado contralateral à lesão, análise por ANOVA de uma via com pós teste de Tukey ($p < 0,05$). As colunas representam as médias e as barras o desvio padrão da média. **** significa diferença em relação ao controle ($p < 0,0001$), ##### significa diferença estatística em relação ao 6-OHDA ($p < 0,0001$), \$\$ significa diferença estatística em relação ao NPSiO₂-TS 10 ($p < 0,01$). 61

Figura 32: Densidade óptica relativa de fibras estriatais para enzima tirosina-hidroxilase (TH+) no núcleo estriado, em relação ao lado contralateral à lesão, análise por ANOVA de uma via com pós teste de Tukey ($p < 0,05$). As colunas representam as médias e as barras o desvio padrão da média. ** indica diferença significativa em relação ao controle ($p < 0,01$); # indica diferença significativa em relação ao 6-OHDA ($p < 0,05$). 62

Figura 33: Fotomicrografias (400x) de astrócitos imunorreativos para proteína GFAP no núcleo estriado dos animais pertencentes aos grupos controle (A), 6-hidroxidopamina (6-OHDA) (B), nanopartículas de sílica veiculadoras de biocompostos de Tradescantia spathacea 10 mg/kg (NPSiO₂-TS 10) (C), nanopartículas de sílica veiculadoras de biocompostos de Tradescantia spathacea 30 mg/kg (NPSiO₂-TS 30) (D). 63

Figura 34: Resultado da quantificação de astrócitos imunorreativos presentes no núcleo estriado, em relação ao lado contralateral à lesão, análise por Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn ($p < 0,05$). As colunas representam as médias e as barras o desvio padrão da média. ** indica diferença significativa em relação ao controle ($p < 0,01$); **** indica diferença

significativa em relação ao controle ($p < 0,0001$); # indica diferença significativa em relação ao 6-OHDA ($p < 0,05$)..... 63

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Organização dos grupos experimentais. Onde: CTL = Controle; NPSiO₂= Nanopartículas de sílica; NPSiO₂-TS = nanopartículas de sílica veiculadoras de biocompostos de *Tradescantia spathacea*..... 42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Pesquisas envolvendo os compostos bioativos encontrados no EATS.	33
Tabela 2: Caracterização química do extrato aquoso de <i>T. spathacea</i>	48

RESUMO

A doença de Parkinson (DP) é uma enfermidade sem tratamentos efetivos, caracterizada pela morte de neurônios dopaminérgicos na substância negra parte compacta que se relaciona a eventos celulares como a neuroinflamação e estresse oxidativo. Diante da lacuna terapêutica na DP, a *Tradescantia spathacea* (*T.spathacea*) é uma herbácea com ação neuroprotetora que, se associada à nanotecnologia, pode ser uma potencial estratégia para redução da limitação farmacocinética, eficaz entrega medicamentosa ao cérebro e atenuação de efeito sedativo. Objetiva-se avaliar o efeito neuroprotetor de nanopartículas de sílica veiculadoras de biocompostos *T. spathacea* (NPSiO₂-TS), em modelo pré-clínico para estudo da DP. Foi realizada obtenção do extrato aquoso de *T. spathacea* (EATS) por infusão e caracterização do mesmo quanto ao rendimento global, quantitativo de ácidos fenólicos e flavonoides totais. Posteriormente foram formuladas nanopartículas de sílica (NPSiO₂) e NPSiO₂-TS (10 e 30 mg/kg). As NPSiO₂, NPSiO₂-TS e EATS foram caracterizadas quanto a morfologia, termogravimetria (TG) e grupos funcionais por Espectroscopia de infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR). O estudo *in vivo* foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso Animal da Universidade Tiradentes (nº 020919). Ratos adultos Wistar (180-250 g) receberam microinjeção intraestriatal de solução salina contendo ácido ascórbico (0,02%) ou 6-hidroxidopamina (6-OHDA, 20 µg/3µL) no núcleo estriado. Os grupos (n=7) experimentais foram: Controle (solução salina/NPSiO₂); Lesão (6-OHDA/NPSiO₂); NPSiO₂-TS (6-OHDA/NPSiO₂-TS 10 mg/kg e 30 mg/kg). Os tratamentos foram administrados por via intranasal (30 µL) diariamente durante 15 dias. Para avaliação funcional, foram utilizados os testes de campo aberto (10º dia, avaliação do número médio de comportamentos de *crossing*, *rearing*, *bolos fecais* e *auto-limpeza*) e cilindro (14º dia, porcentagem de toques contralaterais à lesão). No 15º dia foi realizada eutanásia. Foi realizada imunohistoquímica para avaliação da expressão da tirosina hidroxilase (TH), e da expressão astrocitária (GFAP). Foi utilizado o software *Graph Pad Prism* versão 8.0, considerando $p < 0,05$. O EATS apresentou 21,9 ± 0,43% de rendimento, 16,3 ± 1,3 mg AgE/g, 2,7 ± 0,79 mg RE/g. As NPSiO₂-TS apresentaram morfologia esférica com aglomerados de EATS (30 nm a 1 µm). A avaliação por TG mostrou perda de 14,5% de massa e observou-se através de FTIR estiramentos dos grupos silanois, siloxanos, hidroxila e carbonila, sendo as duas últimas bandas associados a presença de fenóis, flavonoides e cumarinas. Nos testes comportamentais, o grupo 6-OHDA apresentou redução significativa nas médias de *crossing* e *rearing* e aumento de número de bolos fecais quando comparado ao grupo controle, enquanto os animais tratados com NPSiO₂-TS 30 apresentaram recuperação funcional, com aumento significativo no *crossing* e redução da defecação em relação ao grupo 6-OHDA. No teste de cilindro, os grupos controle e NPSiO₂-TS 30 apresentaram uso adequado dos membros superiores (porcentagem de toques contralaterais acima de 50%). A análise histológica evidenciou que as NPSiO₂-TS 30 proporcionaram preservação significativa de neurônios dopaminérgicos e fibras estriatais, assim como atenuação da resposta astrocitária. Conclui-se que as NPSiO₂-TS 30 apresentaram efeito neuroprotetor frente à lesão da via nigroestriatal após lesão por 6-OHDA.

Palavras-chave: Administração intranasal; *Commelinaceae*; Doença de Parkinson; Polifenóis; Sistemas de liberação de fármacos por nanopartículas.

ABSTRACT

Parkinson's disease (PD) is a pathology without effective treatments, characterized by the death of dopaminergic neurons in the substantia nigra pars compacta, which is related to cellular events such as inflammation and oxidative stress. Given the therapeutic gap in PD, *Tradescantia spathacea* (*T.spathacea*) is an herb with neuroprotective action that, when associated with nanotechnology, can be a potential strategy to reduce pharmacokinetic limitation, effective drug delivery to the brain and attenuation of the sedative effect. The aim is to evaluate the neuroprotective effect of silica nanoparticles carriers of *T.spathacea* biocompounds (NPSiO₂-TS), in a preclinical model of PD. The aqueous extract of *T. spathacea* (AETS) was obtained by infusion and its characterization in terms of overall yield, quantity of phenolic acids and total flavonoids. Subsequently, silica nanoparticles (NPSiO₂) and NPSiO₂-TS (10 and 30 mg/kg) were formulated. The NPs were characterized in terms of morphology, thermogravimetry (TG) and functional groups by Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR). The study *in vivo* was approved by the Ethics Committee on Animal Use of Tiradentes University (n° 020919). Adult Wistar rats (180-250 g) received intrastriatal microinjection of saline solution containing ascorbic acid (0.02%) or 6-hydroxydopamine (6-OHDA, 20 µg/3µL) into the striatum nucleus. The experimental groups (n=7) were: Control (saline solution/NPSiO₂); Lesion (6-OHDA/NPSiO₂); NPSiO₂-TS (6-OHDA/NPSiO₂-TS 10 mg/kg and 30 mg/kg). Treatments were administered intranasally (30 µL) daily for 15 days. For functional evaluation, open field (10th day) and cylinder (14th day) tests were used. On the 15th day, euthanasia was performed. Immunohistochemistry will be performed for tyrosine hydroxylase (TH) and astrocytic expression (GFAP). Graph Pad Prism version 8.0 software was used, considering $p < 0.05$. The AETS obtained by infusion showed $21.9 \pm 0.43\%$ yield, 16.3 ± 1.3 mg AgE/g, 2.7 ± 0.79 RE/g. The NPSiO₂-TS showed spherical morphology with EATS clusters (30 nm to 1 µm), in the TG they lost 14.5% of mass and in the FTIR they showed stretching of the silanols, siloxanes, hydroxyl and carbonyl groups, the last two bands being associated with the presence of phenols, flavonoids and coumarins. In behavioral tests, the 6-OHDA group showed a significant reduction in crossing and rearing, and an increase in fecal boluses when compared to the control group. While the animals treated with NPSiO₂-TS 30 showed a significant increase in crossing and a reduction in defecation compared to the 6-OHDA group. In the cylinder test, the control and NPSiO₂-TS 30 groups showed a percentage of contralateral touches above 50%. The NPSiO₂-TS 30 provided significant preservation of dopaminergic neurons and striatal fibers, as well as attenuation of the astrocytic response. It is concluded that NPSiO₂-TS 30 showed a neuroprotective effect against injury to the nigrostriatal pathway after 6-OHDA injury, being effective in this preclinical model for the study of PD.

Keywords: Administration intranasal; *Comelinaceae*; Parkinson's disease; Polyphenols; Nanoparticle drug delivery system.

1 INTRODUÇÃO

A doença de Parkinson (DP) é a segunda desordem neurodegenerativa em prevalência mundial (REICH; SAVITT, 2019). É caracterizada pela perda de neurônios dopaminérgicos na substância negra parte compacta, ocasionando redução de dopamina nos terminais pré e pós-sinápticos do núcleo estriado dorsal (RAZA; ANJUM; SHAKEEL, 2019). Como resultado, observam-se sintomas como bradicinesia, instabilidade postural, tremor em repouso, rigidez muscular, disfagia, dislalia e distúrbios sensoriais (BLOEM, OKUN, KLEIN; 2021).

Sabe-se que a morte neuronal pode estar relacionada a eventos celulares como a neuroinflamação e o estresse oxidativo. A neuroinflamação relaciona-se a uma cascata de efeitos deletérios para os neurônios dopaminérgicos, mediada pela migração desordenada de células da glia, principalmente astrócitos e micróglia (KAUR *et al.*, 2018). A reação astrocitária de forma desordenada interfere no suporte estrutural e metabólico dos neurônios, transmissões sinápticas, produção de moléculas neurotróficas, na barreira hematoencefálica e no auxílio à micróglia na resposta imune (BOOTH *et al.*, 2017).

Proveniente da cascata neuroinflamatória, a sintase de óxido nítrico também interfere na morte neuronal devido à produção de radicais hidroxilas e, conseqüentemente, de espécies reativas de oxigênio (ERO's) como o peroxinitrito (LIU; LIANG; SOONG, 2019). O aumento na produção de ERO's pode induzir morte neuronal e oxidação dopaminérgica devido ao desequilíbrio no potencial de oxidação-redução (redox) das células (BISWAS; ALEXANDER; FRANCIS, 2022). Considerando que a alta atividade metabólica neuronal pode culminar em maior produção de ERO's e que a região da substância negra parte compacta (SNpc) possui vasto conteúdo de espécies oxidáveis, como a dopamina, e teor reduzido de antioxidantes endógenos, como a glutatona, esta região mostra-se particularmente vulnerável à cascata neuroinflamatória que contribui para a degeneração dopaminérgica na DP (TRIST; HARE; DOUBLE, 2019).

O medicamento “padrão-ouro” para tratamento sintomático da DP, a L-3,4-dihidroxifenilalanina, conhecida por Levodopa, visa a atenuação dos sintomas motores (ELSWORTH, 2020). Este medicamento promove benefícios significativos sobre os sintomas da DP, todavia, aproximadamente 80% dos pacientes desenvolvem efeitos adversos como as discinesias e as flutuações motoras no estágio avançado da patologia (KWON *et al.*, 2022). Além dos efeitos indesejados, a Levodopa apresenta baixa disponibilidade após administração por via oral e baixa captação cerebral (HOON *et al.*, 2017).

Diante desta lacuna no tratamento da DP, é imprescindível o desenvolvimento de novas táticas terapêuticas, onde os agentes antioxidantes exógenos provenientes de extratos vegetais podem representar uma alternativa exitosa. A *Tradescantia spathacea* (*T. spathacea*), popularmente conhecida como abacaxi-roxo, é uma herbácea pertencente à

família Commelinaceae, endêmica da América Central e de fácil cultivo (GONZÁLEZ-AVILA *et al.*, 2003). Possui em sua composição química classes de compostos que estão associados à ação antioxidante, anti-inflamatória e neuroprotetora, como ácidos fenólicos, flavonoides, cumarina, iridoide, entre outros (SANTOS, 2021). A atividade antioxidante dos compostos bioativos da *T. spathacea* foi considerada alta, com capacidade de eliminar radicais livres semelhante ao tocoferol e maior que o ácido ascórbico (GONZÁLEZ-ÁVILA *et al.*, 2003).

Em modelo pré-clínico para estudo da DP, o extrato aquoso desta herbácea apresentou ação neuroprotetora frente à ação da toxina 6-OHDA em ratos da linhagem *Wistar*, sendo capaz de atenuar sintomas motores, proteger neurônios dopaminérgicos e fibras estriatais, assim como reduzir a reação astrocitária. Entre as doses administradas (10, 30 e 100 mg/kg), a dose de 100 mg/kg forneceu maior neuroproteção, no entanto provocou efeito ansiolítico e sedativo nos roedores (LOPES, 2024), havendo assim a necessidade de otimização das doses estudadas.

Considerando a possibilidade de veiculação de compostos bioativos em nanomateriais, os sistemas de liberação controlada de fármacos podem ser alternativas promissoras. Os nanomateriais, à base de sílica em especial, vem sendo explorados devido a suas estruturas porosas que permitem uma ampla quantidade de canais vazios, facilitando a adsorção ou encapsulamento de quantidades de biocompostos (NARAYAN *et al.*, 2018).

Características como extensa área de superfície, grande volume de poro e tamanho de poro ajustável são de interesse para o desenvolvimento de materiais para veiculação medicamentosa ou de biocompostos presentes em extratos de materiais vegetais. Essas características e capacidade de funcionalização na superfície dos poros tornam as nanopartículas (NP) de sílica ideais como plataformas nanocarreadoras (RIZK *et al.*, 2018; CIOBANU *et al.*, 2019).

Considerando que o provável mecanismo de morte neuronal na DP está relacionado à cascata neuroinflamatória e apoptose por estresse oxidativo (KAUR *et al.*, 2018), que o extrato aquoso de *T. spathacea* proporciona proteção de neurônios dopaminérgicos e redução da expressão astrocitária, porém requerendo alta dose de administração que leva a efeito adverso sedativo (LOPES, 2024), que as nanopartículas de sílica são eficazes na adsorção de biocompostos e são plataforma nanocarreadoras eficazes (CIOBANU *et al.*, 2019), e que a via intranasal mostra-se uma alternativa não invasiva para pacientes com disfagia, suscita-se que as nanopartículas de sílica veiculadoras de extratos de *T. spathacea* administradas por via intranasal poderão otimizar e contribuir para a neuroproteção frente à lesão da via nigroestriatal dopaminérgica e, dessa forma, representar uma possível alternativa terapêutica a se considerar para a DP.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito neuroprotetor do tratamento intranasal com nanopartículas de sílica veiculadoras de biocompostos da *T. spathacea* em modelo pré-clínico para estudo da doença de Parkinson.

2.2. Objetivos específicos

- Sintetizar e caracterizar nanopartículas de sílica e nanopartículas de sílica veiculadoras de biocompostos da *T. spathacea*;
- Avaliar modificações funcionais após a lesão por 6-hidroxidopamina, em função dos tratamentos, utilizando teste de comportamento;
- Avaliar, histologicamente:
 - a extensão da perda de neurônios dopaminérgicos;
 - a preservação de fibras estriatais;
 - as modificações na expressão astrocitária;

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 Núcleos da base

Os núcleos da base (NB) (representados na figura 1) são um conjunto de estruturas interligadas com localização subcortical, compreendendo o estriado (núcleo caudado e putâmen), globo pálido externo (GPe) e interno (GPi), núcleo subtalâmico (NST), substância negra parte compacta (SNpc) e reticulada (SNr). Essas estruturas formam um complexo circuito que controla a transmissão de sinais neurais no córtex pré-frontal, funcionando de forma dinâmica. O núcleo estriado desempenha um papel crucial nesse circuito, uma vez que recebe projeções de todo o córtex e prioriza a transmissão de sinais para o córtex pré-frontal (PIERCE; PÉRON; 2020).

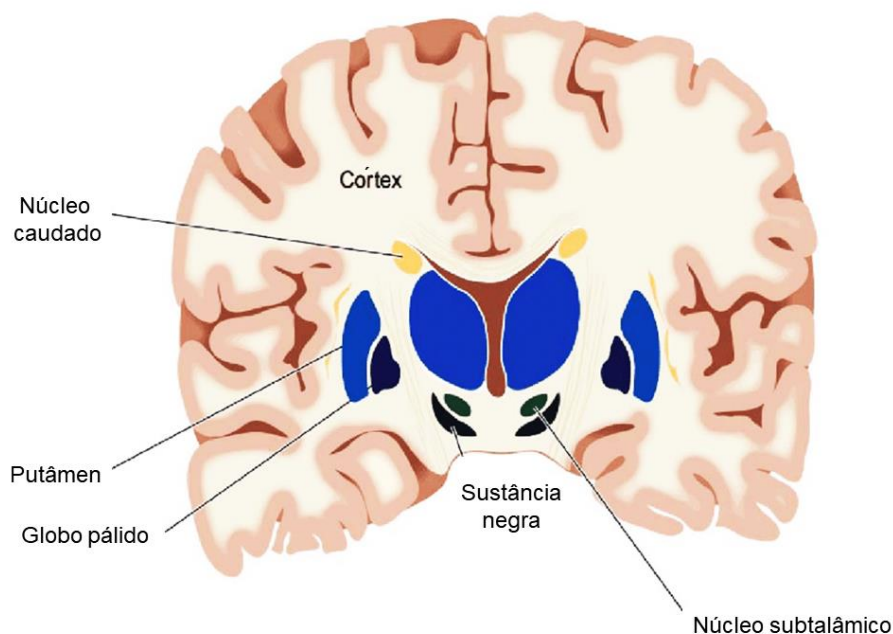


Figura 1: Representação gráfica de corte coronal do cérebro ilustrando os núcleos da base e o córtex. Adaptado de Wu *et al.* (2018).

A teoria mais amplamente aceita sobre a organização dos núcleos da base (NB) é o sistema de duas vias, direta e indireta, que funcionam em equilíbrio funcional, permitindo a facilitação e inibição do movimento, respectivamente, dependendo do fluxo em que a dopamina está agindo (MCGREGOR; NELSON, 2019).

Na via direta, em condições fisiológicas, os neurônios dopaminérgicos da substância negra parte compacta (SNpc) enviam dopamina para o núcleo estriado, onde os neurônios estriatais expressam receptores dopaminérgicos do tipo D1, que, por meio de estímulos inibitórios GABAérgicos, inibem o globo pálido interno (GPi) e a substância negra parte reticulada (SNr). Isso leva à desinibição do tálamo, que por sua vez ativa o córtex cerebral por meio de estímulos excitatórios glutamatérgicos. Na via indireta, os receptores dopaminérgicos

do tipo D2 deixam de inibir o globo pálido externo (GPe), que, por sua vez, inibe o núcleo subtalâmico (NST) por meio de estímulos inibitórios GABAérgicos, resultando em uma diminuição da excitação do GPi e SNr e, assim, mantendo a excitação do tálamo. O tálamo, por sua vez, estimula o córtex cerebral por meio de estímulos excitatórios glutamatérgicos (BOSTAN; STRICK, 2018).

Na doença de Parkinson ocorre a morte de neurônios dopaminérgicos, resultando na inibição dos receptores dopaminérgicos do tipo D1 na via direta, o que leva à perda da inibição do GPi e SNr. Consequentemente, o tálamo e o córtex cerebral são estimulados. Já na via indireta, os receptores D2 são excitados, o que resulta na inibição do GPe por estímulos inibitórios GABAérgicos. Isso leva à liberação do NST, que estimula o GPi e SNr por estímulos excitatórios glutamatérgicos. O GPi e SNr, por sua vez, inibem o tálamo por estímulo GABAérgico, reduzindo assim a estimulação do córtex cerebral (figura 2) (FERRAZOLI *et al.*, 2018).

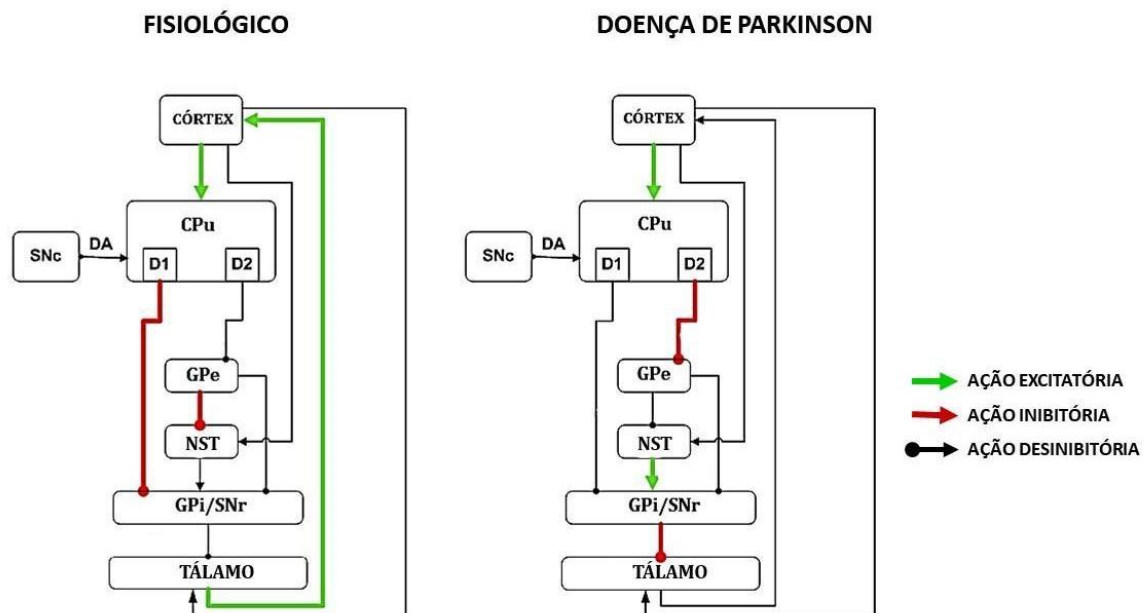


Figura 2: Modelo simplificado das vias direta e indireta dos núcleos da base, com esquema fisiológico e na doença de Parkinson. DA = Dopamina, D1 e D2 = Receptores D1 e D2, CPu = Putâmen e caudado, SNc e SNr = Substância negra parte compacta e reticulada; GPe e GPi = Globo pálido externo e interno, NST = núcleo subtalâmico. Adaptado de Metin e Şengör (2015).

3.2 Doença de Parkinson

3.2.1 Fisiopatologia

Atualmente é a segunda doença neurodegenerativa mais prevalente no mundo, sendo menor apenas que a doença de Alzheimer (DORSEY *et al.*, 2018). Segundo o último estudo de Carga global da doença (GBD, 2019), a prevalência mundial vem aumentando, em 2016 a

patologia já atingia mais de 6,1 milhões de pessoas, mais que o dobro quando comparada aos anos 90, onde 2,5 milhões de indivíduos já tinham o diagnóstico de DP.

A DP é uma desordem neurodegenerativa e está associada à morte de neurônios dopaminérgicos na substância negra parte compacta, que vai ocasionar a redução de dopamina nos terminais pré e pós-sinápticos do estriado dorsal (REICH; SAVITT, 2019). Outra característica marcante na DP é a presença de inclusões intracelulares da proteína α -sinucleína, os corpos de Levy e neurites de Levy (figura 3) (HAYES; 2019).

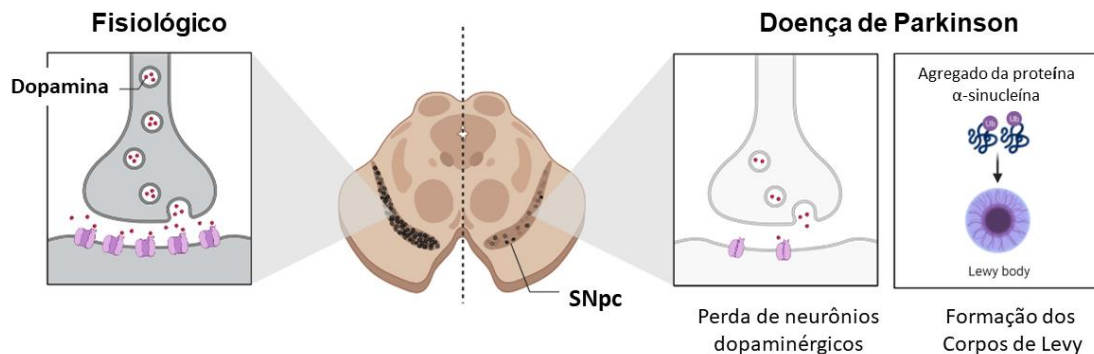


Figura 3: Ilustração compara SNpc em situação fisiológica e na doença de Parkinson (DP), onde na SNpc de um indivíduo com DP pode ser observada redução de neurônios dopaminérgicos nos terminais pré e pós-sinápticos em relação a um indivíduo saudável, além da visualização de agregados de proteína α -sinucleína formando corpos de Levy. Adaptado de National Institute of Neurological Disorders and Stroke National Institutes of Health (2020).

Embora a etiologia da doença de Parkinson (DP) ainda não esteja completamente elucidada, estudos sugerem que o envelhecimento, fatores ambientais e genéticos podem desempenhar um papel importante no desenvolvimento de doenças neurodegenerativas. A morte neuronal associada à DP pode ser desencadeada por cascatas moleculares e eventos celulares, tais como o acúmulo de proteínas, neuroinflamação, estresse oxidativo e disfunção mitocondrial (BLOEM, OKUN, KLEIN; 2021).

O estresse oxidativo é caracterizado pelo acúmulo de espécies reativas de oxigênio (EROs) geradas pelo aumento da produção intracelular dessas espécies ou pela diminuição da capacidade antioxidante endógena. Em altos níveis, as EROs podem ser prejudiciais, levando à apoptose celular, devido à contribuição para o desequilíbrio do potencial oxidação-redução (potencial redox) nas células (BISWAS; ALEXANDER; FRANCIS, 2022).

A neuroinflamação e o estresse oxidativo estão inter-relacionados, mas desempenham funções independentes na DP. A migração desordenada de células da glia, principalmente astrócitos e micróglia, foi observada em estudos *post-mortem* dessa patologia. Essas modificações podem ter um efeito deletério nos neurônios dopaminérgicos, mas os mecanismos subjacentes ainda não estão completamente esclarecidos. Postula-se que, após injúria primária de origem genética ou ambiental, a reação glial contribui para a degeneração dos neurônios dopaminérgicos (KAUR *et al.*, 2018).

Do ponto de vista fisiológico, as células gliais são capazes de modular a formação de radicais livres, a liberação de glutamato em processos de excitotoxicidade, a restauração de lesões na barreira hematoencefálica e o estabelecimento de neurovascularização e neurogênese. No entanto, o excesso ou desregulação da reação astrocitária pode interferir no suporte estrutural e metabólico dos neurônios, nas transmissões sinápticas, na produção de moléculas neurotróficas, na barreira hematoencefálica e na colaboração com a micróglia na resposta imune. A resposta imune glial favorece a liberação do TNF- α , o que leva à liberação de radicais livres e a ativação de proteínas, como a iNOS e as interleucinas pró-inflamatórias (IL-1 α e IL-1 β) (TRIST; HARE; DOUBLE, 2019; KAM *et al.*, 2020).

A disfunção mitocondrial do complexo I da cadeia de transporte respiratório tem sido identificada como um fator que leva à seletiva degeneração, especialmente na substância negra. A disfunção mitocondrial pode aumentar a formação de radicais livres e superóxido, levando ao estresse oxidativo por meio da superóxido dismutase (SOD) (JANKOVIC; TAN; 2020).

3.2.2 Manifestações clínicas

Embora a DP seja amplamente conhecida como um distúrbio de movimento, onde são conhecidos os sintomas motores cardinais (bradicinesia, instabilidade postural, tremor em repouso e rigidez muscular), existem manifestações clínicas não motoras que precedem os sintomas clássico, como a constipação, hipotensão ortostática, disfunção urinária (incontinência ou retenção), ansiedade, depressão, demência, dor e distúrbios de sono (TOLOSA, *et al.*, 2021). Estimativas indicam que ocorre uma depleção de aproximadamente 80% da via nigroestriatal dopaminérgica até o surgimento dos sintomas motores cardinais, no entanto, os sintomas não motores costumam preceder os motores na fase prodrômica (figura 4) (BLOEM, OKUN, KLEIN; 2021).

Inicialmente, há uma perda fisiológica de neurônios devido ao envelhecimento e fatores de risco para a patologia, como fatores genéticos e histórico familiar. Essa perda contínua na fase prodrômica e se intensifica na fase clínica, na qual o diagnóstico geralmente é realizado e as manifestações motoras têm uma gravidade elevada (HEINZEL *et al.*, 2016). A DP tem um impacto financeiro considerável devido à gama de complicações que acometem seus portadores (BACH *et al.*, 2012).

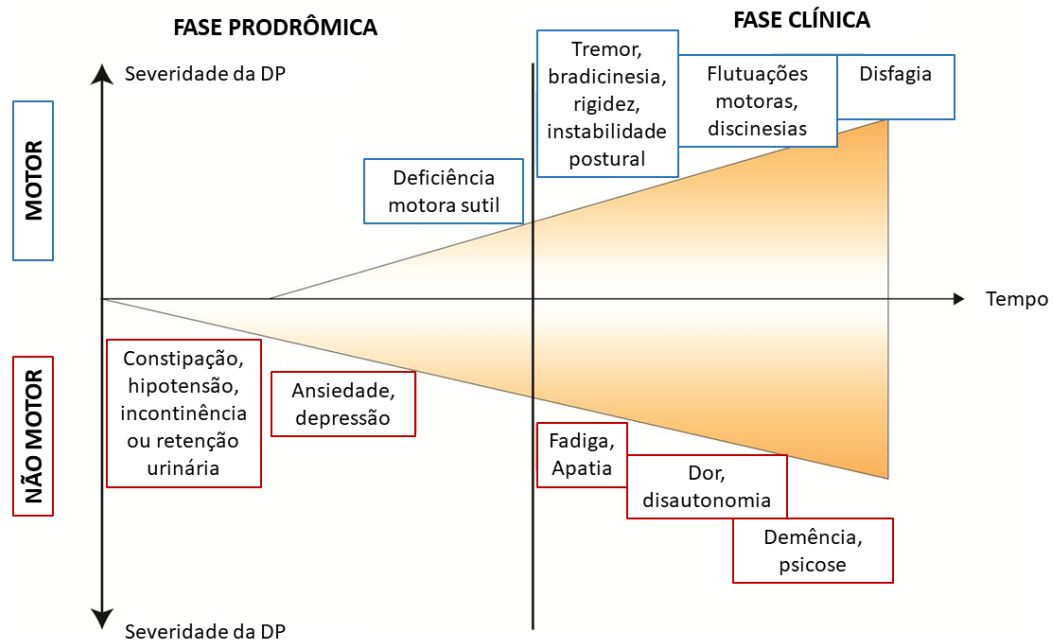


Figura 4: Esquema representativo em forma de linha do tempo das manifestações clínicas da DP na fase prodrômica e fase clínica, onde pode ser observada a evolução dos sintomas motores e não motores de acordo com a severidade da patologia. Adaptado de Jankovic; Tan, 2020.

3.2.3 Modelos experimentais da doença de Parkinson

Uma proporção significativa do conhecimento atual sobre a fisiopatologia e tratamento da DP decorre de modelos *in vivo*, com ênfase no uso de mamíferos para estudo da patologia. Estes modelos têm uma importância fundamental pois possibilita investigação da patologia e o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas (TRIGO-DAMAS *et al.*, 2018).

Os modelos experimentais utilizados para induzir a DP incluem modelos genéticos e modelos neurotóxicos. Os primeiros citados utilizam expressões *in vitro* de mutações relacionadas à patologia, já os neurotóxicos podem ser induzidos por toxinas ambientais como rotenona e paraquat para reproduzir o risco ambiental da DP ou por compostos sintéticos, como a 6-hidroxidopamina (6-OHDA) e 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetraidropiridina MPTP (ZENG *et al.*, 2018).

O modelo neurotóxico por 6- OHDA foi o primeiro e ainda é um dos mais utilizados para replicar a DP, pois induz a degeneração previsível de neurônios dopaminérgicos na SNpc, com consequente redução de dopamina no núcleo estriado, disfunção mitocondrial e déficits comportamentais. É um modelo de reprodutibilidade consistente, no entanto, a 6-OHDA que é uma toxina análoga hidroxilada da dopamina (figura 5), precisa ser administrada por via intracerebral devido sua incapacidade em atravessar a barreira hematoencefálica. Outra desvantagem é que o modelo não consegue reproduzir no animal o surgimento dos corpos de Lewy (JIANG; DICKSON, 2018).

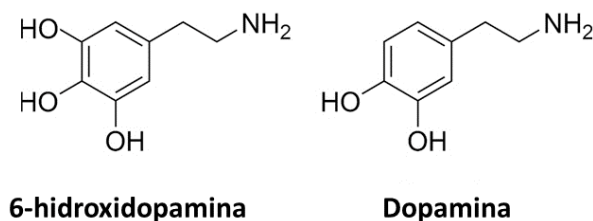


Figura 5: Estrutura química molecular da 6-hidroxidopamina e da dopamina. Adaptado de Zeng *et al.* (2018).

O estresse oxidativo ocasionado pela 6-OHDA é a maior causa da lesão neuronal deste modelo (figura 6), pois esta toxina penetra nos neurônios catecolaminérgicos facilmente por causa da semelhança estrutural com as catecolaminas endógenas e alta afinidade pelo transportador de dopamina ou noradrenalina. A 6-OHDA se oxida rapidamente ao entrar no neurônio e produz ERO's como os radicais hidroxila e superóxido, que levarão a disfunção mitocondrial, que consequentemente irá gerar apoptose (CHIA; TAN; CHAO, 2020)

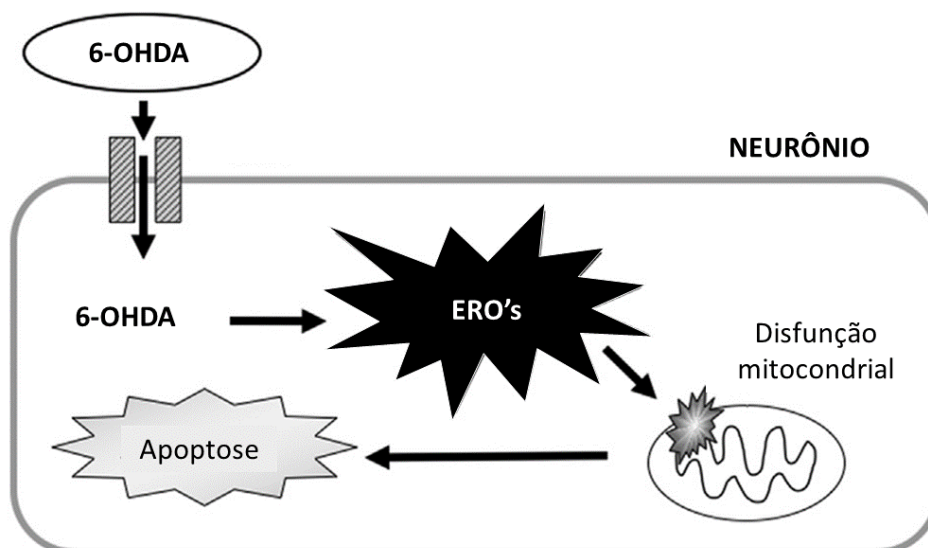


Figura 6: Ilustração sobre o mecanismo de ação da 6-hidroxidopamina (6-OHDA), onde após entrar no neurônio a toxina oxida-se e produz espécies reativas de oxigênio (ERO's), levando a disfunção mitocondrial e consequentemente apoptose do neurônio. Adaptado de Kaji *et al.*, 2020.

A administração direcionada da 6-OHDA no estriado afetará primeiro os terminais axônicos nessa região e, em seguida, provocará a degeneração dos neurônios dopaminérgicos na SNpc, levando a uma depleção parcial (20-85%), e provocando morte neuronal imediata no local da lesão e progride até 28 dias (DA SILVA *et al.*, 2016). Por ser progressivo, o modelo de lesão da via nigroestriatal é mais adequado para estudos de neuroproteção (PENTTINEN *et al.*, 2016).

Após a indução do modelo animal, são realizadas avaliações funcionais através de testes comportamentais. Entre os testes mais difundidos está o teste de campo aberto, desenvolvido em 1934 por Hall com a finalidade de avaliar locomoção e estado emocional dos animais, assim como permite analisar o efeito da lesão intracerebral e a atividade exploratória

global dos animais. O comportamento do animal é determinado pelo conflito entre o impulso para a exploração e o repulso com lugares abertos, desprotegidos e iluminados (LEIKAS *et al.*, 2017).

Para isto, é utilizada uma arena de madeira cercada por paredes de forma que o animal não possa fugir e subdividida em quadrantes para permitir a avaliação de quatro parâmetros: (1) *Crossing* – comportamento de exploração horizontal, quantidade de quadrantes percorridos pelo animal sobre as quatro patas; (2) *Rearing* – exploração vertical, vezes que o animal se mantém apenas com as patas posteriores; (3) *Grooming* – quantidade de vezes que o animal realiza o comportamento de autolimpeza; (4) Defecação – quantidade de bolos fecais expelidos ao longo do teste (WALSH; CUMMINS, 1976) (figura 7).

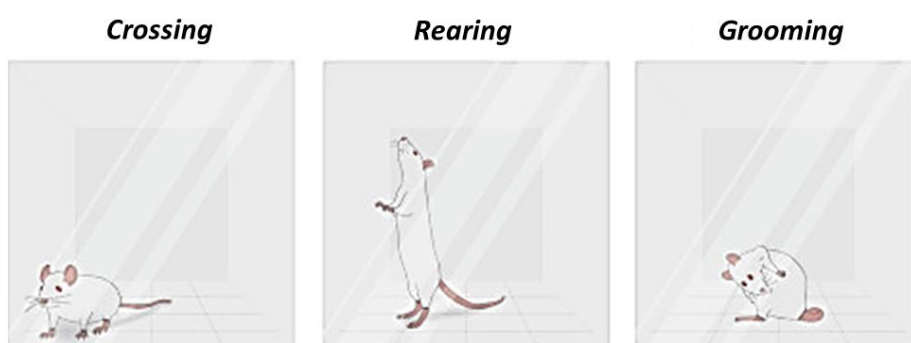


Figura 7: Ilustração mostrando três parâmetros do teste de campo aberto. Fonte: Valvassori; Quevedo, 2017.

Os animais com maior comprometimento neuronal após a administração de 6-OHDA apresentam menor desempenho na locomoção, visto que a toxina se auto-oxida e desencadeia cascata neuroinflamatória, levando a aumento de ERO's, disfunção mitocondrial e morte de neurônios dopaminérgicos. Ocorre redução de glutathione peroxidase, SOD e CAT intraestriatal (TU *et al.*, 2019). Além disso, a redução de atividade GABAérgica e aumento do glutamato, visto que estes neurotransmissores juntamente com a dopamina são fundamentais no desempenho motor, pode justificar a rigidez e tremores, que reduzem o *crossing* e *rearing* (SINGH; KUMAR, 2018).

Sugere-se que a defecação é a atividade motora do animal que designa o seu estado emocional, quando alta associada a baixa locomoção indica a ansiedade e/ou estresse do animal. Da mesma forma, a escolha do animal para se isolar em cantos do aparato ou centralmente serve como um indicador seletivo de ansiedade ou busca por proteção no novo ambiente (ZIMCIKOVA; EVA, 2017).

O teste do cilindro é outra forma de avaliação do roedor, possibilitando mensurar a extensão da lesão cerebral a partir da lateralização espontânea dos membros dianteiros do animal, já que a injeção unilateral da 6-OHDA pode causar comprometimento motor dos membros. Os animais com depleção dopaminérgica unilateral mostrarão a preferência pelo uso do membro ipsilateral à lesão (SAMPAIO *et al.*, 2017).

A observação da assimetria dos membros anteriores é determinada durante a exploração vertical (figura 8), onde o animal entra em contato com a parede do cilindro de acrílico e é feita uma mensuração de acordo com o membro que tocar: contralateral a lesão (membro afetado), ipsilateral a lesão (membro não afetado) ou ambos (simultaneamente) (MAGNO *et al.*, 2019).

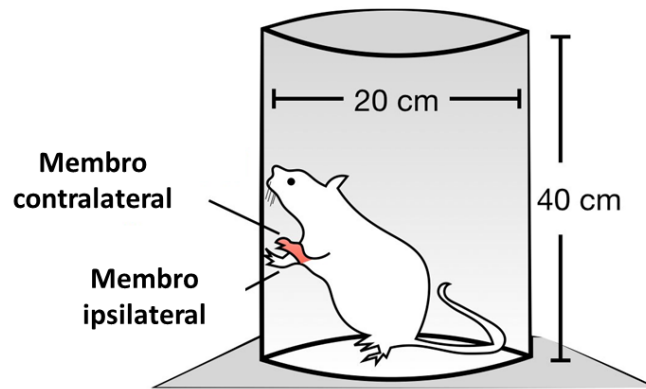


Figura 8: Ilustração de animal realizando o toque espontâneo com membro dianteiro ipsilateral durante o teste do cilindro. Fonte: Magno *et al.*, (2019).

3.2.4 Medidas terapêuticas

Diante das possibilidades terapêuticas, existem os métodos farmacológicos e os não farmacológicos, que quando associados podem promover melhoria da qualidade de vida de indivíduos com DP. Nessas táticas terapêuticas existe a ação de fonoaudiólogos, fisioterapeutas, terapeutas ocupacionais, entre outros profissionais (GERSZT, 2014). O tratamento fisioterapêutico pode ser citado como grande aliado para auxílio no desempenho da marcha, postura, equilíbrio, força e resistência, possibilitando amenizar ou retardar os sintomas motores (RADDER *et al.*, 2020).

Entre os tratamentos farmacológicos, a levodopa ou L-DOPA ganha destaque por atenuar as manifestações clínicas, sendo considerado o medicamento “padrão-ouro” para tratamento da patologia em questão (ELSWORTH, 2020). Embora seja amplamente utilizada, cerca de 4 a cada 5 indivíduos que fazem uso contínuo e a longo prazo estão susceptíveis a desenvolver flutuações motoras e discinesias, que podem ser caracterizadas por movimentos anormais e involuntários estereotipados (KWON *et al.*, 2022). Além disto, a L-DOPA apresenta baixa disponibilidade após administração por via oral e baixa captação cerebral, da dose administrada aproximadamente 30% atinge a circulação sistêmica e apenas 1% chega a nível cerebral (HOON *et al.*, 2017).

Também podem ser citados os agonistas dopaminérgicos, que irão atuar reproduzindo a ação da dopamina nos receptores dopaminérgicos. Geralmente são utilizados como monoterapia na fase inicial da DP ou como adjuvante quando há flutuações motoras ou quando a Levodopa não está reduzindo os sintomas de forma satisfatória. A desvantagem

dessa classe medicamentosa é a afinidade por alguns receptores, desta forma podem apresentar seletividade e atuar em regiões específicas do encéfalo. Também são associados a efeitos adversos como tontura, náuseas, alucinações e distúrbios do sono (LATT *et al.*, 2019).

Os inibidores da monoamina oxidase (R~54TF5MAO) atuam evitando a degradação de neurotransmissores, como a dopamina, pois esta classe medicamentosa impede a ação da MAO. Consequentemente, os níveis de dopamina serão menos prejudicados nos indivíduos com DP e os sintomas motores cardinais serão atenuados. Os inibidores da MAO são mais eficazes em pacientes com manifestações clínicas avançadas ou com discinesias ocasionadas pela levodopa (SCHAPIRA *et al.*, 2017).

Os inibidores da COMT (catecol-O-metiltransferase) atuam bloqueando a COMT, assim reduzindo a degradação de levodopa e de dopamina, logo a biodisponibilidade da levodopa irá aumentar a nível cerebral. Geralmente são utilizados como medicamentos adjuvantes em indivíduos com flutuações motoras, no entanto não previnem nem retardam o surgimento de complicações motoras, pelo contrário, entre os efeitos adversos está o aumento das discinesias relacionadas ao uso da L-DOPA (FERREIRA *et al.*, 2018).

A indústria farmacêutica vem apostando em alterações nas vias de administração e em diferentes formulações para veiculação da L-DOPA, além de terapias simultâneas, a fim de minimizar os efeitos adversos deste tratamento (LOTIA; JANKOVIC, 2016). No entanto, atualmente ainda não há tratamentos efetivos para a patologia. Diante disto, reconhece-se que há uma lacuna na terapêutica da DP e ressalta-se a necessidade do desenvolvimento de novas táticas, especialmente com foco na neuroproteção e não somente na atenuação de sintomas motores (ELSWORTH, 2020).

3.3 Produtos naturais e compostos bioativos

O termo “compostos bioativos” ou “biocompostos” refere-se a compostos naturalmente presentes na natureza e que apresentam efeitos benéficos para a saúde humana. Estes biocompostos estão relacionados com diversas propriedades biológicas como atividade antioxidante (SAKAMULA; THONG-ASA, 2018), anti-inflamatória (ALMUTAIRI *et al.*, 2017), neuroprotetora (HUSSEIN *et al.*, 2018), anticarcinogênica (GARCÍA-VARELA *et al.*, 2016), entre outras.

Entre as classes de biocompostos atualmente estudados, os flavonoides merecem destaque em virtude das ações biológicas e terapêuticas apresentados em estudos pré-clínicos e clínicos (LI *et al.*, 2018; MORAES *et al.*, 2022). Os flavonoides é um dos grupos de biocompostos mais importantes e diversificados de origem vegetal que habitualmente encontram-se em folhas, flores, raízes e frutos das plantas. As concentrações de biocompostos desta referida classe em uma determinada planta pode sofrer interferências

motivadas por diversos fatores naturais como escassez hídrica, alterações bruscas de temperatura ao longo das estações do ano, fazendo com que ocorra uma produção em excesso de radicais livres, logo esta classe atua contra o estresse oxidativo (ULLAH *et al.*, 2020).

Os flavonoides apresentam uma série de especificidades farmacológicas que lhes permite atuar em sistemas biológicos e assim beneficiar a saúde humana. Os flavonoides são compostos polifenólicos que possuem carbono (C6-C3-C6) em sua estrutura básica compondo anéis aromáticos e anel pirano. A partir da estrutura de carbono e nível de oxidação, dividem-se em seis subclasses: flavonas, flavonóis, flavanóis, flavanonas, isoflavonas e antocianinas (FAN *et al.*, 2022).

Apesar de ainda não serem completamente conhecidos, apresentam um importante potencial terapêutico e diferentes atividades biológicas, como atividade antimicrobiana, antifúngica, antiviral, antibacteriana, antiparasitária, imunomoduladora, anti-inflamatória, antioxidante (BELLAVITE, 2023) e neuroprotetora (MAITRA *et al.*, 2023), sendo este o foco do trabalho.

Outra classe que se destaca quanto às atividades biológicas são os ácidos fenólicos, compostos fenólicos que podem ser divididos basicamente em derivados de ácidos benzóicos e de ácidos cinâmicos. São encontrados em formas livres, em frutas e vegetais, ou em formas conjugadas, comumente em folhas, grãos e sementes, onde representam a maior parte dos compostos fenólicos. São clivados por hidrólise ácida ou alcalina e também por ação de enzimas. São amplamente distribuídos no reino vegetal (apesar de alguns também serem produzidos por fungos) e importantes nas interações entre plantas e microrganismos, agindo como moléculas de sinalização e defesa (ARNOSO *et al.*, 2019).

3.4 *Tradescantia spathacea*

A *T. spathacea* ou *Rhoeo discolor*, sinônimo aceito cientificamente, é popularmente denominada de abacaxi-roxo, moisés-no-berço ou espada de Iansã (figura 9). É uma herbácea ornamental pertencente à família Commelinaceae, endêmica do Sudeste do México e América Central. De fácil acesso e cultivo, está inserida na medicina popular para o tratamento de feridas, infecções de vias aéreas, processos inflamatórios, câncer, doenças sexuais, infecções bacterianas e fúngicas e como ansiolítico (AGUILAR *et al.*, 1994; GONZÁLEZ-AVILA *et al.*, 2003).



Figura 9: Fotografia da *Tradescantia spathacea*. Fonte: Arquivo pessoal (2020).

Na América do Sul é utilizada como bebida funcional, semelhante a um chá (ROSALES-REYES *et al.*, 2008), onde sua atividade antioxidante é consistentemente classificada alta em comparação com os chás de ervas, apoiando ainda mais a hipótese de que esta planta tem potencial para ser popularizada como uma bebida funcional, não só na América do Sul (REYES-MUNGUÍA *et al.*, 2009; TAN *et al.*, 2015).

Através de triagem fitoquímica foram identificados terpenos, taninos, saponinas, antocianinas e alcalóides. Em análises cromatográficas foram encontrados compostos antioxidantes como flavonóides (rutina, quercetina, epigallocatequina, rhoenina e antocianina pigmento nº2) (TAN *et al.*, 2015) e ácidos fenólicos (ácido clorogênico, ácido gálico, ácido vanílico, ácido vanílico glicosado, ácido p-cumárico) (GARCÍA-VARELA *et al.*, 2016).

Alguns dos compostos encontrados na *T. spathacea*, estão associados ao aumento dos antioxidantes endógenos, como a SOD, catalase e glutathione, como o ácido p-cumárico (SAKAMULA; THONG-ASA, 2018), rutina (ALMUTAIRI *et al.*, 2017), quercetina (MAGALINGAM *et al.*, 2016), entre outros. Assim como a redução também há reportado na literatura a redução da peroxidação lipídica, da produção de TNF- α , da atividade da acetilcolinesterase (AChE) e dos níveis de corticosterona, promovida por compostos como o kaempferol (HUSSEIN *et al.*, 2018), rutina (ALMUTAIRI *et al.*, 2017) e quercetina (LI *et al.*, 2018).

Em estudo prévio do grupo de pesquisa (LOPES, 2024), foi realizada avaliação do extrato aquoso de *Tradescantia spathacea* (EATS) por cromatografia líquida de ultra eficiência acoplado à espectrometria de massa (Anexo 3), onde os biocompostos identificados estão

relacionados à mecanismos anti-inflamatórios, antioxidantes e neuroprotetoras, como pode ser visualizado na tabela abaixo (tabela 1).

Tabela 1: Pesquisas envolvendo os compostos bioativos encontrados no EATS.

COMPOSTO	CLASSE	ATIVIDADE BIOLÓGICA	REFERÊNCIAS
Ácido verátrico	Ácido fenólico	Regula a expressão de IL-6 e óxido nítrico; Aumenta SOD, CAT e GSH; Atenua estresse oxidativo e apoptose	SARAVANAKUMAR; RAJA, 2011; CHOI <i>et al.</i> , 2012; YU <i>et al.</i> , 2021;
Ácido cafeico	Ácido fenólico	Atenua a perda de neurônios dopaminérgicos e os déficits motores; Reduz a expressão de α -sinucleína, micróglia e mediadores inflamatórios	ZAITONE <i>et al.</i> , 2019; ZHANG <i>et al.</i> , 2019;
Ácido p-cumárico	Ácido fenólico	Regula a expressão de TNF- α e IL-6; Atenua estresse oxidativo e apoptose neuronal; Aumenta níveis de SOD e GSH; Protege neurônios dopaminérgicos e atenua déficits motores;	DAROI; DHAGE; JUVEKA, 2022; DOLRAHMAN <i>et al.</i> , 2023;
Fraxetina	Cumarina	Regula a expressão de IL-1 β , IL-6, TNF- α e óxido nítrico; Atenua ativação de micróglia <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> ; Atenua comportamento ansioso e depressivo	DENG <i>et al.</i> , 2022; AHMED <i>et al.</i> , 2023
Vicenin-2	Flavonoide	Combate a radicais livres; Em sinergia com outros compostos, reduziu comportamento antidepressivo (nanopartículas de <i>Passiflora edulis</i>)	ALVES <i>et al.</i> , 2020; RETAMOZO <i>et al.</i> , 2023
Vestitol	Flavonoide	Reduz a expressão de IL-1 β , IL-1 α ; Atenua a ativação das vias NF- κ B	BUENO-SILVA <i>et al.</i> , 2022

Fonte: Compilado do autor (2023). Onde: IL-1 α = interleucina 1 alfa; IL-1 β = interleucina 1 beta; IL-6 = interleucina 6; SOD = superóxido dismutase; NF- κ B = fator nuclear kappa B; GSH = glutatona; CAT = catalase.

Em experimento prévio de modelo animal para estudo da DP induzido por 6-OHDA, roedores foram tratados diariamente com este mesmo extrato (EATS) nas doses de 10, 30 ou 100 mg/kg por via oral. Foi observado que os animais tratados com EATS apresentaram melhora na atividade motora no campo aberto (*crossing* e *rearing*), atenuação de comportamento ansioso (redução do quantitativo de bolos fecais), atenuação da extensão da perda neuronal e atenuação da resposta astrocitária. No entanto, neste estudo, a maior dose do EATS além da atividade neuroprotetora, gerou efeito sedativo nos animais (LOPES, 2024), visando atenuar este efeito, foi considerada a possibilidade de impregnação dos biocompostos do EATS em nanopartículas de sílica.

3.5 Nanopartículas de sílica

As nanopartículas (NP) geralmente são sistemas constituídos por polímeros biodegradáveis, sintéticos ou naturais e têm sido utilizadas em vários segmentos tecnológicos e biomédicos pela possibilidade de modificação das estruturas químicas, das funcionalidades de superfície e do diâmetro das partículas (STEPHEN *et al.*, 2022).

As nanopartículas de sílica (figura 10), por sua vez, são consideradas nanoreservatórios grandes e estáveis, em especial as mesoporosas que, por possuírem poros com diâmetro entre 2 e 50 nm, apresentam flexibilidade na adsorção de moléculas com tamanho e geometria variada. Além disso são biocompatíveis, não tóxicas, facilmente sintetizadas e com mesoporosidade estável. Devido a estas características, estes nanomateriais têm sido cada vez mais usados em sistemas de carregamento controlado de fármacos ou biocompostos (RASTEGARI *et al.*, 2021).

A sílica, cuja fórmula química é SiO_2 , é um composto presente no grupo dos materiais silicatos, uma vez que é constituída principalmente por silício e oxigênio. Os átomos de oxigênio, localizados nos vértices dos tetraedros de SiO_4 , são compartilhados por tetraedros adjacentes, formando a rede tridimensional característica da sílica. A estrutura da sílica pode se organizar de forma cristalina ou ser amorfa. Na sílica cristalina esses tetraedros são arranjados tridimensionalmente de maneira regular e ordenada (KONG, 2021).

A funcionalização das sílicas permite, portanto, o ajuste das propriedades da superfície do suporte e, conseqüentemente, gera materiais que encontram as mais diversas aplicações em cromatografia, nanotecnologia, reconhecimento molecular, adsorção e catálise (GOSCIANSKA; OLEJNIK; NOWAK, 2017).

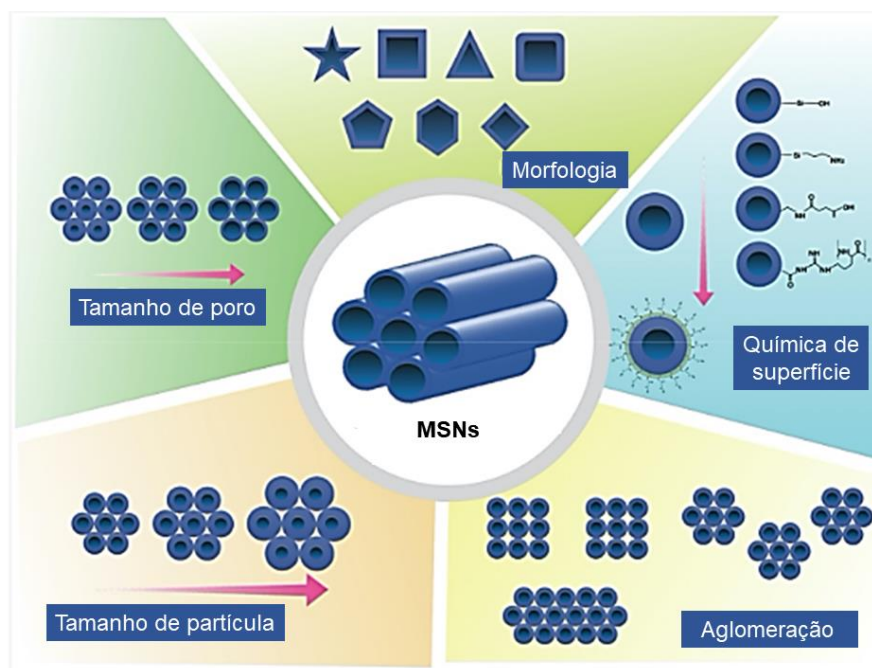


Figura 10: Ilustração das propriedades físico-químicas ajustáveis das nanopartículas de sílica mesoporosa (MSNs). Adaptado de Rastegari *et al.*, (2021).

Além do seu excelente desempenho com não toxicidade, boa biocompatibilidade e alta estabilidade térmica, pode-se controlar o tamanho dos poros, volume de poros, ordenação mesoestrutural e a forma de partículas ajustando as condições experimentais (KONG, 2021).

Existem alguns tipos de sílica mesoporosa com diferentes arranjos estruturais ou tamanho dos poros desenvolvidos alterando as condições de reação e/ou os precursores de partida, incluindo MCM-48, MCM-50, SBA (Santa Bárbara Amorfo – Mobil Corporation), FDU (Universidade Fudan), KIT (Instituto Avançado de Ciência e Tecnologia da Coreia), MSU (Michigan State University) e FSM (Folhas Dobradas Materiais mesoporosos) (RAWTANI *et al.*, 2018).

Estas sílicas mesoporosas possuem destaque, já que apresentam alta estabilidade mecânica, térmica e química, além de ter algumas propriedades passíveis de serem controladas, como a morfologia e a porosidade. Apesar de sua estabilidade química, a sílica mesoporosa possui, em sua superfície, sítios sensíveis ao pH, como os grupos silanóis (Si-OH), que possibilitam a funcionalização da sua superfície por modificação devido à ligação de moléculas, geralmente de organossilanos na superfície externa e no interior dos poros. Estes silanos com grupos químicos permitem a interação da matriz funcionalizada com íons positivos e negativos, dependendo do agente funcionalizante empregado (STEPHEN *et al.*, 2022).

3.6 Nanopartículas de sílica em *drug delivery systems*

Os sistemas de administração controlada de fármacos (*drug delivery systems*) representam um conjunto de estratégias possíveis utilizadas para atingir níveis terapêuticos efetivos de uma substância bioativa no local de ação. Esses sistemas podem ser utilizados para melhorar as características farmacocinéticas e farmacodinâmicas dos fármacos utilizados atualmente, além de auxiliar novas moléculas bioativas a superarem as barreiras biológicas e eventuais problemas causados pela natureza química dos princípios ativos (OLIVEIRA *et al.*, 2022). As NP estão sendo utilizadas como método de proteção e entrega de compostos bioativos, pois devido a sensibilidade à exposição térmica e oxidação, os biocompostos podem se degradar (MAQSOUDELOU *et al.*, 2020).

Nos últimos anos, os *drug delivery* nanoestruturados, têm recebido a atenção dos pesquisadores por aprimorarem a entrega controlada e o sucesso dos tratamentos farmacológicos. As NP passíveis de modulação, ou seja, que podem ser vetorizadas ativamente e/ou tornadas reativas a gatilhos bioquímicos, são de especial interesse para pesquisas, por apresentarem propriedades idealizadas para os *drug delivery systems*, tais como: a entrega direcionada do fármaco no sítio de ação e o controle da liberação do fármaco em doses terapêuticas durante períodos planejados (LEOPOLDO *et al.*, 2020).

Nesse contexto, as nanopartículas de sílica são promissoras para administração controlada de fármacos, já que apresentam uma série de vantagens sintéticas e propriedades estruturais e biológicas favoráveis para aplicação na nanomedicina (OLIVEIRA *et al.*, 2022). O potencial das NPSiO₂ como nanocarreadoras de medicamentos para o tratamento de doenças neurodegenerativas, em especial da DP e Alzheimer, vem sendo alvo de pesquisa (ATTIA *et al.*, 2023). Foi reportado na literatura a utilização de NPSiO₂ para carreamento da Rivastigmina em experimento *in vivo*, as NP apresentaram biocompatibilidade com as células neuronais, aumento da disponibilidade e não foram relatados sinais de toxicidade (BASHARZAD *et al.*, 2022).

No entanto, ainda existem questionamentos sobre a neurotoxicidade. Em estudo *in vivo* e *in vitro* foi observada agregação de α -sinucleína, disfunção mitocondrial, estresse oxidativo e comprometimento da autofagia, no entanto o desenho experimental foi de administração de NPSiO₂ durante 3 meses. Estas NP apresentavam diâmetros de 356 a 509 nm (YUAN *et al.*, 2022).

Já no estudo *in vivo* da DP induzido por MPPT, realizado por Guzmán-Ruiz *et al.* (2019), foram administradas nos animais NPSiO₂ de 150 nm durante 5 dias por via oral. Não houve aumento significativo de peroxidação lipídica e TNF- α , além disso houve aumento dos níveis estriatais de dopamina, noradrenalina e serotonina. Confirmando que a sílica foi um nanocarreador adequado e que não gerou neurotoxicidade em modelo animal.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Local da pesquisa

A pesquisa foi realizada no Laboratório de Morfologia e Patologia Experimental (LMPE) e no Núcleo de Estudos em Sistemas Coloidais (NUESC), ambos no Instituto de Tecnologia e Pesquisa (ITP), e no biotério da Universidade Tiradentes (UNIT).

4.2 Material vegetal

Foram utilizadas folhas de *T. spathacea*, coletadas no município de Aracaju no estado de Sergipe, Brasil (10°58'7.536"S, 37°3'28.469"O). A identificação botânica da planta estudada já foi realizada, de acordo com o Guia de coleta botânica proposto pelo Herbário Tiradentes - AJU, onde a exsicata depositada recebeu a numeração 0845 (Anexo 1).

As folhas frescas foram pesadas, individualmente lavadas com água destilada, onde o excesso de água foi retirado com papel toalha. Posteriormente, as folhas foram cortadas em tamanho aproximado de 1 cm², acomodadas em recipientes de forma que ficassem espalhadas, então foram colocadas em estufa de circulação de ar a 45° C por 48 horas. Após a secagem, as amostras em triplicata passaram por verificação do teor de umidade na balança termogravimétrica. Logo após, as partículas foram separadas por tamanho através de peneiras granulométricas da série Tyler conectadas ao peneirador mecânico. Por fim, as amostras com tamanho de partícula de 16-32 *mesh* foram armazenadas em recipientes de vidro, protegidas da luz e em temperatura ambiente para posterior extração (GARCÍA-VARELA *et al.*, 2015).

4.3 Extração

A obtenção do extrato aquoso de *Tradescatia spathacea* (EATS) ocorreu pelo método de infusão, utilizando a proporção de 1 g de biomassa (16-32 *mesh*) para 30 mL de água destilada. Inicialmente, na biomassa previamente pesada foi adicionada água destilada a 100°C, onde o material ficou em repouso por 15 min e sem aquecimento adicional. Após este tempo, foi realizada filtração com filtro microporoso (TAN *et al.*, 2015).

Ao fim das extrações, o extrato foi acomodado em recipientes de vidro, previamente identificados e pesados, e colocados na estufa de circulação de ar a 45°C por 48 h para obtenção do extrato seco. Os recipientes foram pesados diariamente a fim de acompanhamento da evaporação do solvente. Amostras foram colocadas na balança termogravimétrica com a finalidade de verificação de teor de umidade, onde ao fim das 48 h apresentaram menos de 10% de umidade.

4.4 Caracterização do EATS

4.4.1 Determinação de rendimento global

O rendimento da extração foi obtido em percentual (%) por meio da equação (1), conforme Machado *et al.*, (2017).

Equação (1):
$$\%R = \left(\frac{Mes}{Mag} \right) \times 100$$

Onde %R = Porcentagem de rendimento global; Mes = Massa de extrato seco (g); Mag = Massa da amostra granulada (g).

4.4.2 Quantificação de ácidos fenólicos

A determinação do conteúdo de ácidos fenólicos do EATS foi feita usando o utilizando o reagente Folin-Ciocalteu, procedimento descrito por Barbosa *et al.* (2019). Foi pipetado um volume de 30 µL (em triplicata) de EATS em concentração de 250 ppm, este volume foi misturado com 150 µL do reagente de Folin-Ciocalteu (1:10), seguido por uma adição de 120 µL de solução de carbonato de sódio a 7,5% (p/v) (Na₂CO₃). A microplaca com as soluções foi mantida sem contato com a luz e incubada por 15 min a 45°C em estufa de circulação de ar, posteriormente por 30 min em temperatura ambiente. A leitura da quantificação dos compostos fenólicos na amostra foi realizada em espectrofotômetro UV-VIS a um comprimento de onda de 765 nm. A curva de calibração (figura 11) foi preparada com ácido gálico (5-100 µg/mL; R²= 0,9991). O conteúdo total de ácidos fenólicos foi expresso como miligrama de ácido gálico equivalente em grama de EATS (mg AgE/g).

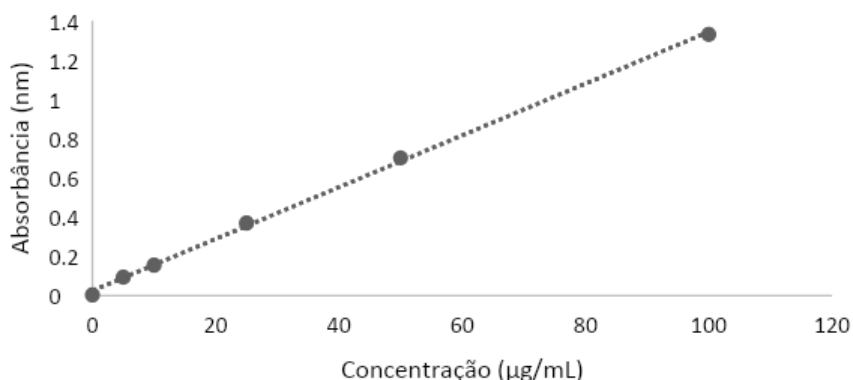


Figura 11: Curva de calibração para solução padrão de ácido gálico.

4.4.3 Quantificação de flavonoides totais

O conteúdo de flavonoides totais do EATS foi determinado com o método colorimétrico de cloreto de alumínio, como descrito em Barbosa *et al.* (2019). Foram adicionados 45 µL de nitrato de alumínio (10%), 45 µL de acetato de potássio (1,0 M), 30 µL de EATS (250 ppm) e

100 μL de metanol. As soluções foram homogeneizadas nos poços da microplaca e submetidas a banho ultrassônico durante 30 min. Após este período, foi realizada a leitura da absorbância em espectrofotômetro UV-VIS a um comprimento de onda de 425 nm. Foi utilizada a curva de calibração (figura 12) para solução padrão de rutina (600 ppm) que foi preparada a partir da pesagem de 60 mg de rutina, transferido para balão volumétrico e adicionado 100 mL de metanol, a solução permaneceu 30 min em banho ultrassônico em temperatura ambiente e foi mantida sem contato com a luz. A curva de calibração foi preparada com rutina (5-140 $\mu\text{g/mL}$; $R^2 = 0,9986$) e a concentração de flavonoides foi expressa como miligrama de rutina equivalente em grama de EATS (mg RE/g).

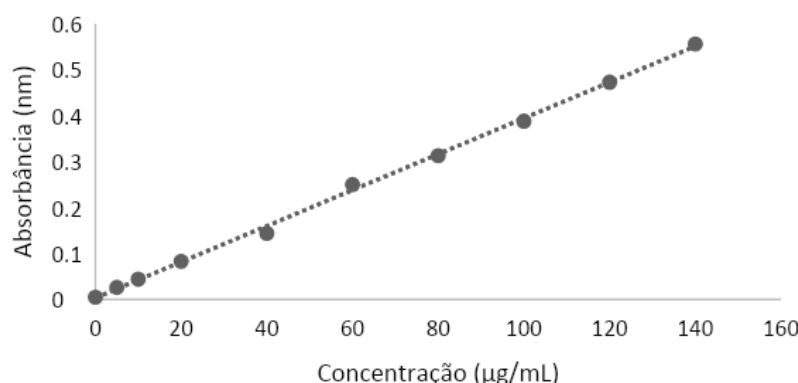


Figura 12: Curva de calibração para solução padrão de rutina.

Destaca-se que a caracterização química por cromatografia líquida de ultra eficiência do EATS obtido por infusão foi realizada pelo grupo (LOPES, 2024) e os compostos identificados podem ser observados no Anexo 3.

4.5 Obtenção de nanopartículas

Foi realizada a síntese de nanopartículas de sílica (NPSiO_2) e de nanopartículas de sílica veiculadoras de *T. spathacea* ($\text{NPSiO}_2\text{-TS}$). Ambas foram sintetizadas pela adição da mistura de 6 mL de tetraetoxisilano (TEOS) como precursor de sílica, e as $\text{NPSiO}_2\text{-TS}$ tiveram adição de 9 mL de EATS diluído em água destilada (15 mg/mL). A reação foi deixada por 10 min em agitação contínua. Em seguida, foram adicionados 3 mL de solução de ácido clorídrico (HCl, 1 M) e a mistura foi agitada continuamente por 15 min a temperatura ambiente. Obteve-se uma formação de gel, que foi mantida em estufa de circulação de ar por 12 horas a 40°C. No dia seguinte, aumentou-se a temperatura da estufa para 60° C e manteve-se por mais 24 h. Por fim, obteve-se pó, após maceração, as amostras apresentaram tonalidade branca (NPSiO_2) e amarronzada ($\text{NPSiO}_2\text{-TS}$) (figura 13), e foram armazenadas em recipiente hermético para posterior utilização (PERIAKARUPPAN *et al.*, 2022).

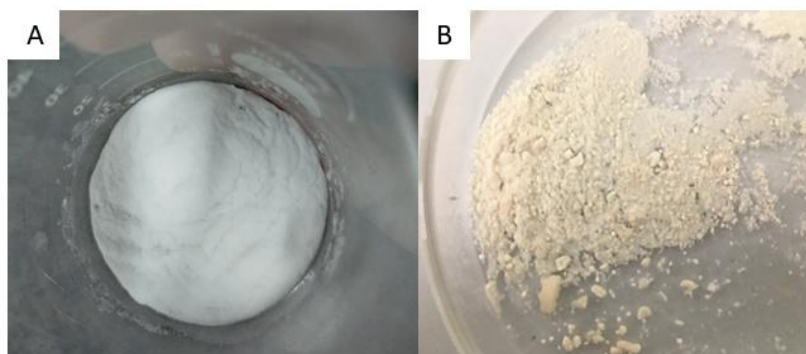


Figura 13: Aspecto das amostras de NPSiO₂(A) e NPSiO₂-TS (B). Arquivo pessoal (2022).

4.6 Caracterização das nanopartículas

4.6.1 Morfologia

A morfologia das amostras foi observada por microscopia eletrônica de varredura (MEV), usando um microscópio eletrônico (modelo JEOL JSM-IT200LA). As amostras foram metalizadas com ouro e sobrepostas em fita de carbono sob o suporte metálico com uma tensão de 15 KV. Antes das análises, amostras foram submetidas a um pré-tratamento a 100°C na estufa 12 horas (OLIVEIRA *et al.*, 2019).

4.6.2 Termogravimetria

Para verificação da degradação térmica de compostos bioativos sugeridos pela perda de massa do material obtido em função de uma programação controlada de temperatura foi realizada análise termogravimétrica (TG) e derivada termogravimétrica (DTG). Foram analisadas: extrato aquoso de *T. spathacea* (EATS), nanopartículas de sílica (NPSiO₂) e nanopartículas de sílica veiculadoras de *T. spathacea* (NPSiO₂-TS). As condições experimentais foram: faixa de temperatura de 25 a 1000°C; nitrogênio com vazão de 50 mL/min, cadinho de cerâmica com 5,7 mg de amostra (CARUCCI *et al.*, 2021).

4.6.3 Calorimetria exploratória diferencial

Foi avaliada a calorimetria exploratória diferencial (DSC) com o intuito de verificar a quantidade de energia envolvida nos eventos térmicos durante um programa controlado de temperatura a qual as amostras foram submetidas, assim como, identificar as ocorrências de eventos endotérmicos ou exotérmicos envolvidos nas amostras de EATS, NPSiO₂ e NPSiO₂-TS.

Foi utilizado o aparelho TA *Instruments* DSC Q20. Inicialmente as amostras foram pesadas (3 a 6 mg) e colocadas em um cadinho de alumínio hermeticamente fechado. As condições experimentais foram: faixa de temperatura de 30°C a 300°C; taxa de fluxo de nitrogênio de 50 mL/min; ciclos de aquecimento: 1) isotérmico por 1 min; 2) rampa 10°C/min para 50°C; 3) isotérmico por 1 min; 4) rampa 10°C/min para 300°C; 5) isotérmico por 1 min (NUNES et al., 2021).

4.6.4 Espectroscopia de infravermelho com Transformada de Fourier

Afim de verificar a presença do EATS nas NPSiO₂-TS através das vibrações dos grupos funcionais, foi realizada espectroscopia de infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) nas amostras de EATS, NPSiO₂ e NPSiO₂-TS. Foi utilizado um espectrômetro de refletância total atenuada (ATR) (modelo Invenio R, marca Bruker). A medição dos espectros de absorção das amostras foi realizada na região do infravermelho (4000 a 600 cm⁻¹) utilizando pastilhas de KBr, com 16 varreduras e resolução máxima de 4 cm⁻¹ (ALSAAD et al., 2020).

4.7 Ensaio *in vivo*

4.7.1 Animais

Para o desenvolvimento deste projeto, foram respeitados os princípios éticos da experimentação animal de acordo com a Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), seguindo as normas para a prática didático-científica de acordo com a Lei nº 11.794/2008, e resolução normativa nº 53 de 19 de maio de 2021, que dispõe sobre o uso de animais para fins científicos e didáticos. O projeto foi submetido à apreciação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Tiradentes, aprovado com o protocolo 020919 (Anexo 2). Nesta pesquisa foram utilizados ratos heterogêneos adultos, da linhagem *Wistar* (*Rattus norvegicus albinus*), do sexo masculino, com 2-3 meses de idade, pesando entre 180 e 250 g. Estes foram acomodados em trios, em gaiolas de polipropileno padrão e com cama tipo maravalha. O ambiente foi mantido refrigerado e com controle de ciclo claro/escuro de 12 h. A fonte de alimentação foi a dieta padrão Labina® (Purina, São Paulo, Brasil), e também foi disponibilizada água, ambas sem restrições.

4.7.2 Grupos experimentais

Os animais foram divididos em 4 grupos (n = 7). Todos os grupos foram submetidos à estereotaxia. As induções intracerebrais foram realizadas por meio de microinjeção

intraestriatal de 6-OHDA ou solução salina e o tratamento com as nanopartículas foi realizado por via intranasal (30 µL).

É valido ressaltar que toxicidade aguda da *T. spathacea* é acima de 5.000 mg/kg (TAN et al., 2014), sendo assim classificado como categoria 5 pelo *Globally Harmonised System* (GHS), que engloba produtos que devem ser utilizados com cautela (OECD, 2001). Às formulações das NP veiculadoras de *T. spathacea* foram realizadas acrescentando doses de 10 e 30 mg/kg de EATS, baseando-se em estudo prévio, onde o EATS teve efeito neuroprotetor sendo administrado diariamente em 10, 30 ou 100 mg/kg por via oral por 30 dias, além disto, os animais não apresentaram sinais de toxicidade aguda em rins e fígado (LOPES, 2019).

O quadro 1 possibilita melhor visualização dos grupos experimentais e tratamento que foi recebido:

GRUPO (n=7)	INDUÇÃO VIA CEREBRAL	TRATAMENTO VIA INTRANASAL
CLT	Salina 0,9%	NPSiO ₂
6-OHDA	6-OHDA	NPSiO ₂
NPSiO ₂ -TS 10	6-OHDA	NPSiO ₂ -TS (10 mg/kg)
NPSiO ₂ -TS 30	6-OHDA	NPSiO ₂ -TS (30 mg/kg)

Quadro 1: Organização dos grupos experimentais. Onde: CTL = Controle; NPSiO₂= Nanopartículas de sílica; NPSiO₂-TS = nanopartículas de sílica veiculadoras de biocompostos de *Tradescantia spathacea*.

4.7.3 Procedimento cirúrgico

Inicialmente os animais foram pesados e então anestesiados, por via intraperitoneal, com cloridrato de cetamina (10 mg/kg) e cloridrato de xilazina (100 mg/kg), volume de 0,05 mL/100 g de massa corporal do animal. A estereotaxia foi realizada seguindo a metodologia de Sampaio *et al.*, (2017). Para realização da microinjeção no estriado direito, foi tomado como ponto zero o Bregma foram utilizadas as coordenadas estereotáticas (figura 13): Anteroposterior (AP) +1,0; mediolateral (ML) +3,0; dorsoventral (DV) -5,0. Através de microseringa Hamilton (10 µL) conectada à bomba de infusão automática (Insight, Brasil) foram administrados 3 µL de 6-hidroxidopamina (6-OHDA) (Sigma-Aldrich, Brasil) diluída em solução salina (0,9%) contendo 0,02% de ácido ascórbico (Sigma-Aldrich, Brasil). A microinjeção foi realizada a uma taxa de infusão de 1 µL/min. A cânula conectada à microseringa através de tubo de polietileno (PE 10) foi mantida por 5 min para evitar refluxo. O grupo controle também foi submetido ao procedimento supracitado, no entanto recebeu solução salina contendo 0,02% de ácido ascórbico ao invés da 6-OHDA. Finalizado o procedimento cirúrgico, foi realizada sutura com fio de poliglactina 910, 5-0 (*PolySuture®*). Ao

4.7.4. Avaliações funcionais

4.7.4.1 Teste de campo aberto

A avaliação foi realizada em uma arena de madeira com área quadrada (4.355 cm²), cujas laterais medem 35 cm de altura e a base é subdividida em 16 quadrantes (figura 14). A mesma foi limpa com álcool a 20% entre um teste e outro para que o cheiro do animal anterior não influenciasse no posterior. O teste foi realizado com todos os animais no 10º dia após a lesão, de forma individual e teve duração de 5 minutos (MARTINS *et al.*, 2016).

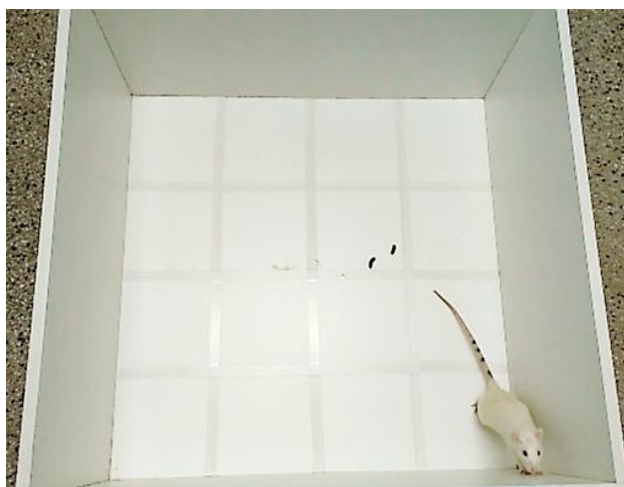


Figura 15: Fotografia do equipamento de campo aberto utilizado, com animal realizando *rearing*. Arquivo pessoal.

4.7.4.2 Teste do cilindro

O teste foi realizado em um cilindro transparente medindo 30 cm de altura e 16 de diâmetro. Atrás do cilindro foram posicionados dois espelhos a fim de permitir uma visão 360º (figura 15). A avaliação ocorreu no 14º dia pós-cirúrgico, onde cada teste teve duração de 5 min e foi registrado em vídeo. Os toques na parede do cilindro foram quantificados quando realizados com o membro dianteiro contralateral ou homolateral, sendo que os toques simultâneos foram excluídos (REAL *et al.*, 2017).



Figura 16: Fotografia do equipamento do teste do cilindro com animal realizando toque contralateral à lesão. Arquivo pessoal.

A porcentagem dos toques contralaterais se deu pela equação 2:

$$(2) \quad \%Tc = \frac{Tc}{Th+Tc} \times 100$$

Onde: Tc = Toques contralaterais; Th = Toques homolaterais.

4.7.5 Eutanásia e preparo histológico

No 15º dia, seguindo a Resolução normativa nº 53 do CONCEA (2021), os animais foram eutanasiados com sobredosagem de anestésicos, cloridrato de cetamina (300 mg/kg) e cloridrato de xilazina (30 mg/kg), por via intraperitoneal. O encéfalo, foi retirado por meio de dissecação, acomodado em formalina a 10% por 7 dias, passou por processamento histológico automatizado no aparelho Lupetec (modelo PT09 TS) e foi incluído em parafina. Neste processamento, o material foi desidratado em série alcoólica crescente, diafanizado em série de xilol e impregnado por parafina, após a impregnação o material foi incluído em parafina a 55-60°C para obtenção de blocos rígidos.

Os blocos foram então levados ao micrótomo MR2014 (O patologista, Brasil), para fornecer os cortes de 5 µm de espessura. Após serem seccionados, os cortes foram colocados para flutuar no banho histológico digital (modelo BH201, Lupetec, Brasil) e posteriormente foram colocados sobre lâminas gelatinizadas e levados para secar em estufa à 37°C.

4.7.6 Análise imunohistoquímica

As lâminas com cortes de encéfalos foram submetidas a desparafinização, desidratatação, lavagem com tampão fosfato (*phosphate buffered saline* (PBS) 0,1 M, pH 7,4) e recuperação antigênica em *steamer* com tampão citrato (pH 6,0) em 3 ciclos de 5 min. Em seguida, foi realizado o bloqueio da peroxidase endógena (H_2O_2 - 1% em PBS) por 7 min.

As imunohistoquímica realizadas foram com os seguintes anticorpos primários: (1) anti tirosina-hidroxilase (TH, marcador de neurônios dopaminérgicos, produzido em camundongos, na diluição 1:500, clone TH-16, lote nº T2928, Sigma Aldrich Chemical Company, St Louis MO, USA) e (2) monoclonal anti proteína ácida fibrilar glial (GFAP, marcador de astrócitos, produzido em camundongos, clone S206A-8, 1:100, lote SAB5201104; Sigma Aldrich Chemical Company, St Louis MO, USA). Os anticorpos primários foram preparados para incubação juntamente com o diluente de anticorpo primário (Sigma-Aldrich, Sigma Chemical Co., St Louis, USA) durante 2 h em temperatura ambiente. Posteriormente foi realizada a incubação com anticorpo secundário (DAKO LSAB2 kit, DAKO Corp., Carpinteria, CA), conjugado com complexo streptavidina-peroxidase (DAKO Corp., Carpinteria, CA), na ordem Biotinilado por 30 min, seguido por Estreptividina por mais 30 min.

Para revelação, as secções foram incubadas com o tetracloreto de 3'3'-diaminobenzidina (kit DAB, Vector Laboratories) diluído em tampão tris (*Tris-buffered saline*) (TBS) pH 7,4) com H_2O_2 (0,3%) e lavadas em água destilada. As lâminas foram desidratadas e diafinizadas, por fim as lamínulas foram fixadas com bálsamo do Canadá sobre as lâminas. Foi realizada contracoloração com hematoxilina de Harris por 3min nas lâminas de GFAP (VIVANCO-ESTELA *et al.*, 2021).

4.7.7 Quantificação de células

As análises serão realizadas a partir das lâminas obtidas na imunohistoquímica para TH e GFAP. As imagens foram obtidas através do microscópio Olympus CX31 acoplado à câmera de vídeo Olympus. Foi utilizado o *software Image J*, do *National Institute of Health Image* [W. Rasband, domínio público *National Institute of Mental Health* (<http://rsb.info.nih.gov>)] para quantificação de corpos celulares marcados em uma área de 480 μm da SNpc (TH) e núcleo estriado (GFAP). Para a quantificação de células foram selecionadas lâminas com 3 ± 1 secções de regiões íntegras. Foram feitas imagens de todas as secções contidas nas lâminas, com ampliação de 100x onde foram visualizadas presença ou ausência de células imunorreativas no tecido. O resultado foi expressado pela média de neurônios (TH) e astrócitos (GFAP) correspondente às secções e as comparações serão realizadas entre os grupos (MARQUES *et al.*, 2019).

4.7.8 Densidade óptica relativa para TH

Foram utilizadas as lâminas obtidas na imunohistoquímica para TH. As imagens foram obtidas através do microscópio Olympus CX31 acoplado à câmera de vídeo Olympus. O *software Image J* foi utilizado para verificação da densidade óptica relativa, como parâmetro foi aplicada uma escala de cinza variando de 0 a 255, onde 0 é a cor mais escura e representa a maior intensidade. Em cada secção foram avaliados os quadrantes do núcleo estriado: dorsomedial, dorsolateral e ventrolateral, com uma área de 480 μm . As médias das áreas foram divididas pelo córtex, que foi definido como área controle. Os resultados foram expressos pela porcentagem da densidade óptica do lado ipsilateral em relação ao lado contralateral (MARQUES *et al.*, 2019).

4.8 Análise estatística

Os dados foram submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk, as amostras que apresentaram uma distribuição Gaussiana foram submetidas à análise de variância (ANOVA) de uma via, com pós-teste de Tukey. As amostras que não atenderam ao pressuposto de normalidade foram submetidas a estatística não paramétrica por teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn. As diferenças foram consideradas significativas para valores de $p < 0,05$. Foi utilizado o *software Graph Pad Prism* versão 8.0.

5 RESULTADOS

5.1 Caracterização do EATS

O EATS foi caracterizado quanto ao rendimento global, quantitativo de ácidos fenólicos e flavonoides totais, onde os resultados das quantificações com o respectivo erro padrão de cada análise, podem ser analisados na tabela 2.

Tabela 2: Caracterização química do extrato aquoso de *T. spathacea*.

Caracterização	Valor
Rendimento global	21,94 ± 0,43
Ácidos fenólicos	16,30 ± 1,3
Flavonoides totais	2,73 ± 0,79

Os valores são expressos por: Porcentagem (%) – Rendimento global; Miligrama de ácido gálico equivalente em grama de extrato (mg AGE/g) – Quantitativo de ácidos fenólicos; Miligrama de rutina equivalente em grama de extrato (mg RE/g) – Quantitativo de flavonoides totais.

5.2 Caracterização das nanopartículas

5.2.1 Morfologia

A partir das amostras analisadas por MEV (figura 16), pode-se verificar que as NPSiO₂ apresentaram aspecto esférico e de superfície rugosa. Já as NPSiO₂-TS apresentaram aspecto semelhante às NPSiO₂, no entanto houve aglomeração de partículas de EATS com formato irregular, distribuídos de forma homogênea em toda superfície da NP. Os tamanhos das NPSiO₂-TS variaram entre 30 nm em 1 µm, onde na figura abaixo podem ser visualizadas algumas partículas de menor diâmetro.

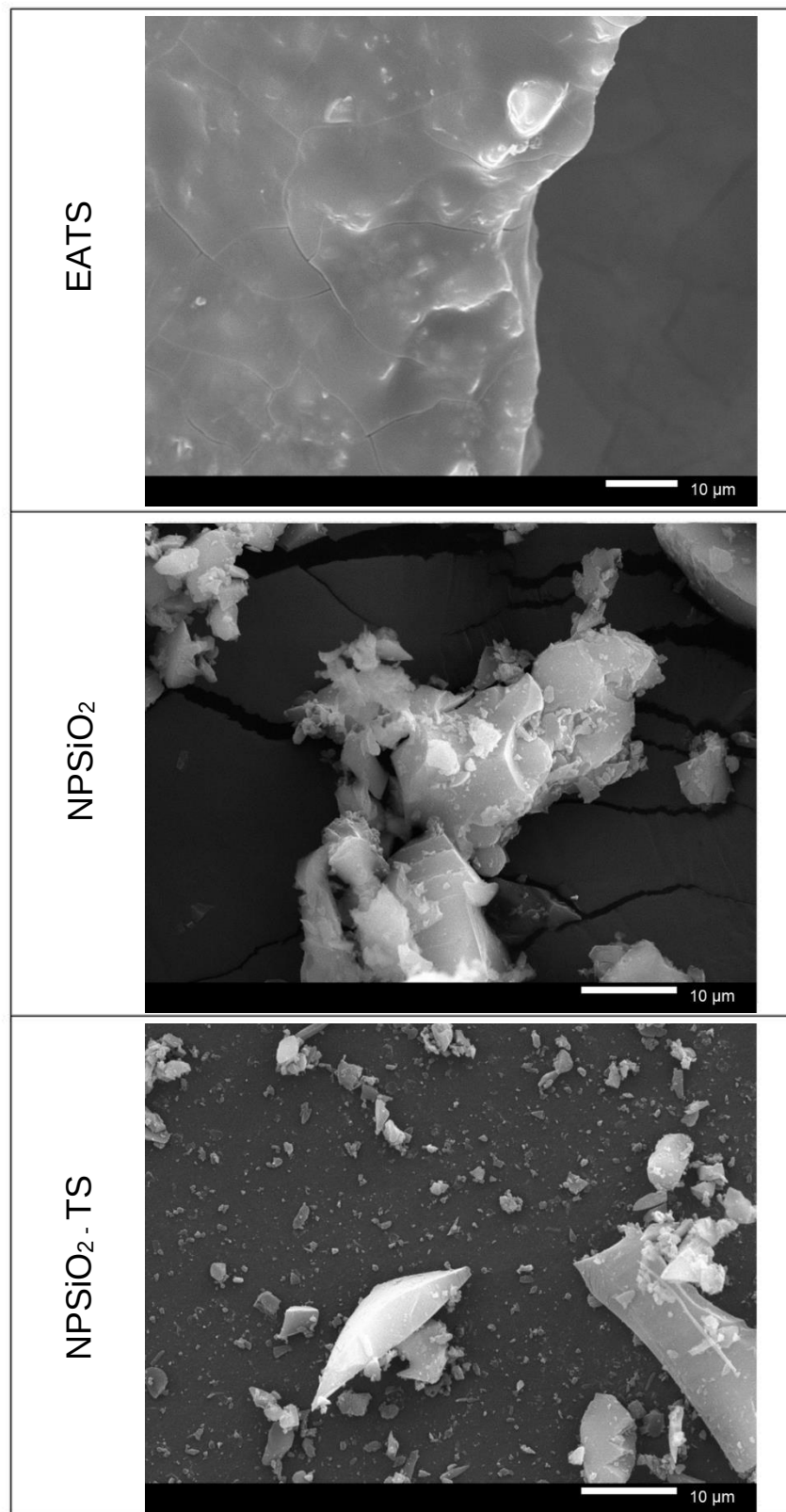


Figura 17: Micrografias de extrato aquoso de *Tradescantia spathacea* (EATS), nanopartículas de sílica (NPSiO₂), e nanopartículas de sílica veiculadoras de biocompostos de *Tradescantia spathacea* (NPSiO₂-TS).

5.2.2 Análise termogravimétrica

Na termogravimetria foram analisadas as amostras de EATS (figura 17), NPSiO_2 e $\text{NPSiO}_2\text{-TS}$ (figura 18). Foi possível verificar que as amostras de contendo sílica (NPSiO_2 e $\text{NPSiO}_2\text{-TS}$) mantiveram-se mais estáveis, perdendo menos massa ao longo do tempo e temperaturas pré-estabelecidas quando comparadas ao extrato vegetal puro. A perda de massa em todas as amostras iniciou em aproximadamente 50°C e podem estar associadas à água e à biocompostos mais sensíveis à exposição térmica.

O extrato vegetal aquoso (EATS) apresentou maior instabilidade, com degradações acentuadas em diversos momentos que resultaram em perda de 72,5% de massa durante a análise. Pôde-se notar perdas nas faixas térmicas: 150 (13%), 250-300 (15,3%), 440 (8,6%), 650 (5,8%) e 930°C (29,8%).

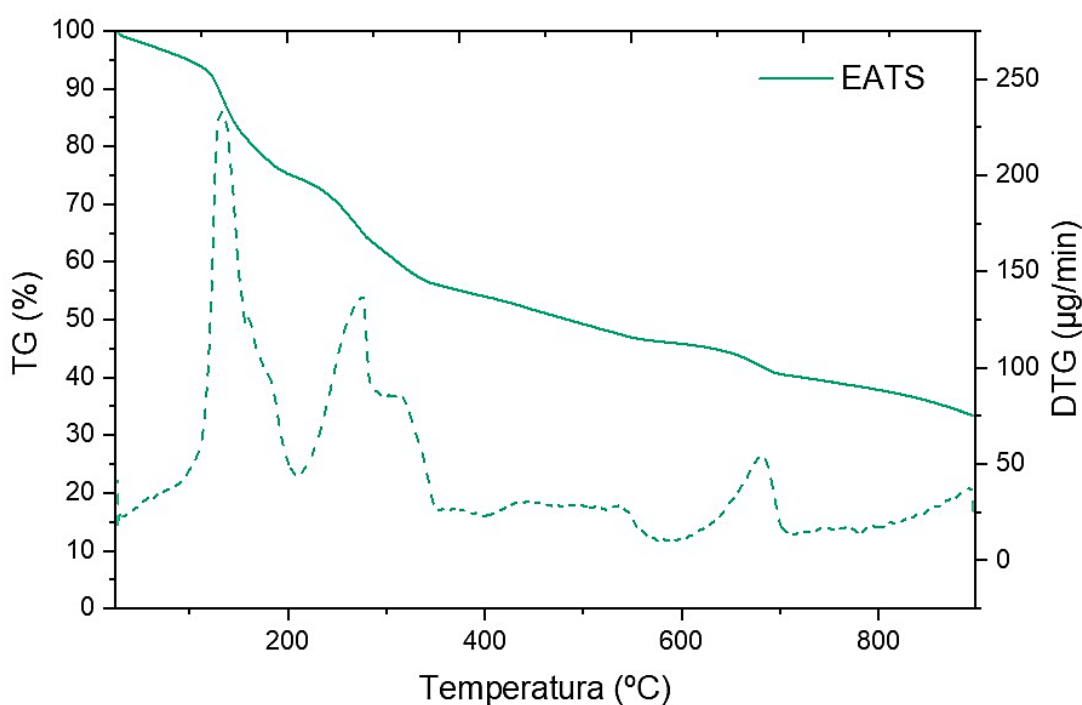


Figura 18: Análise termogravimétrica da amostra de EATS. Expresso em porcentagem de massa perdida (%TG – linha contínua) e porcentagem da derivada por minuto (DTG %/min – linha tracejada). Onde EATS = Extrato aquoso de *Tradescantia spathacea*.

As NPSiO_2 apresentaram perda total de 19,8% durante toda a amostra, onde observou-se que a perda de massa mais acentuada foi ao atingir aproximadamente 100°C (10,8%), logo após notou-se perdas discretas em 150, 250, 425, 545 e 795°C , que juntas somaram 9% de degradação térmica.

As NP veiculadoras de extrato vegetal ($\text{NPSiO}_2\text{-TS}$) apresentaram apenas 14,5% de perda de massa ao longo de toda análise. Na exposição entre 50 a 150°C houve degradação que resultou em perda de 11,8% de massa, no entanto, logo após houveram discretas perdas de 1,9% e 0,8% nas temperaturas de 200- 250°C e 400°C , respectivamente.

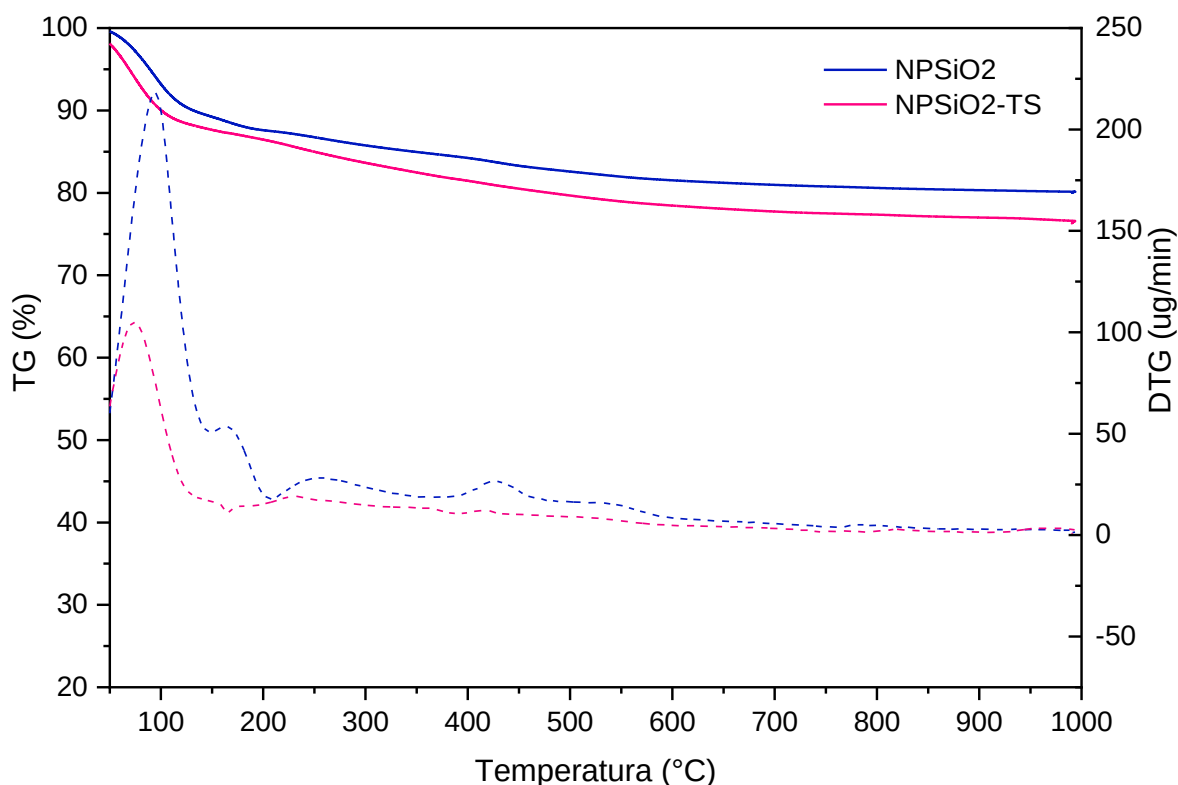


Figura 19: Análise termogravimétrica da amostra de NPSiO_2 e $\text{NPSiO}_2\text{-TS}$. Expresso em porcentagem de massa perdida (%TG – linha contínua) e porcentagem da derivada por minuto (DTG %/min – linha tracejada). Onde NPSiO_2 = nanopartículas de sílica; $\text{NPSiO}_2\text{-TS}$ = nanopartículas de sílica veiculadoras de biocompostos de *Tradescantia spathacea*.

É válido ressaltar que a amostra de EATS foi a mais instável, apresentando uma acentuada perda de massa em vários momentos da análise, no entanto, quando o extrato vegetal é adicionado às nanopartículas de sílica é obtido um material mais estável e resistente à perda de massa com exposição à temperatura, sugerindo que a sílica foi uma boa escolha para associação ao EATS quando trata-se de estabilidade.

5.2.3 Calorimetria exploratória diferencial

A calorimetria exploratória diferencial pode ser usada para caracterizar as propriedades térmicas de materiais, neste estudo foram investigadas as amostras de EATS, NPSiO_2 e $\text{NPSiO}_2\text{-TS}$.

A figura 20, mostra o termograma de DSC do EATS, o qual apresenta picos de eventos exotérmicos na faixa de aproximadamente 50°C. Apresenta também picos endotérmicos em 156,66°C e em 174,99°C, este último correspondendo a decomposição do extrato. A entalpia de fusão em pôde ser calculada em 4,206 J/g (138,85°C) e 265,2 J/g (164,81°C).

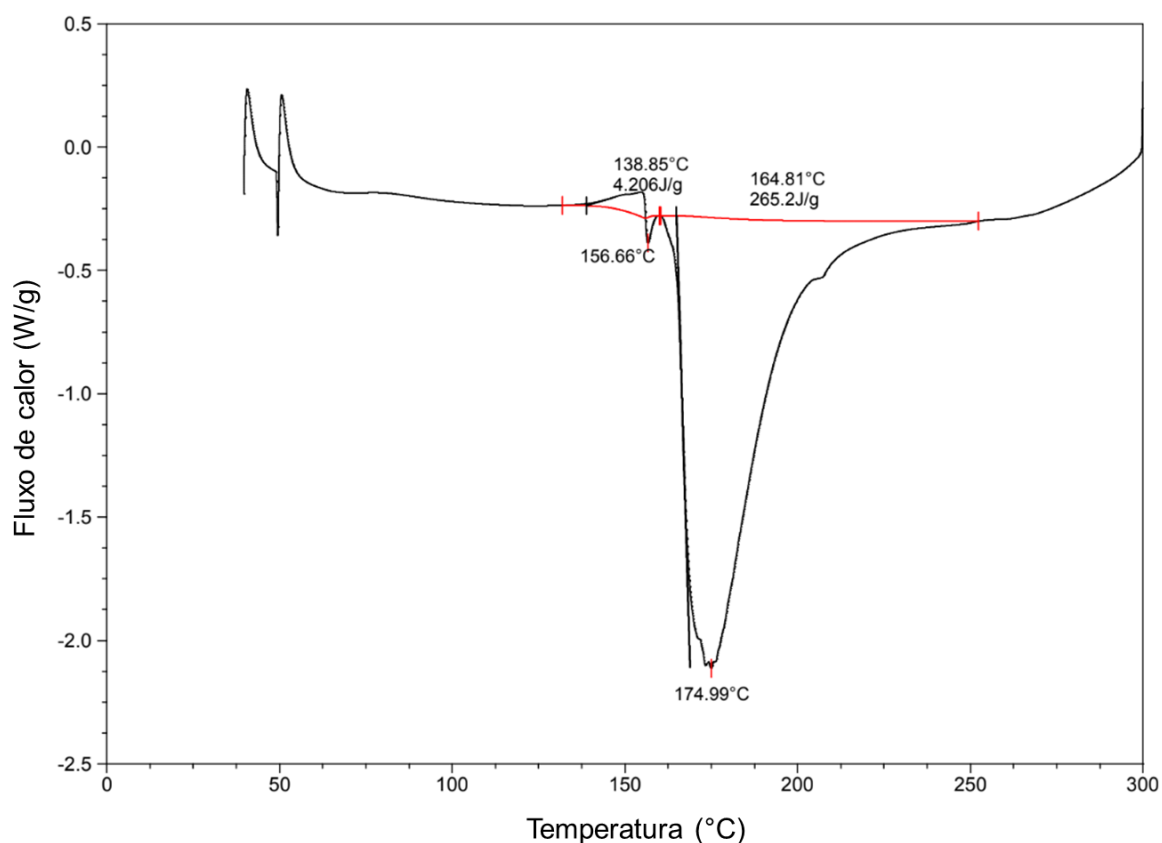


Figura 20: Termograma de DSC da amostra EATS. Onde EATS = Extrato aquoso de *Tradescantia spathacea*. Expresso em fluxo de calor (W/g) de acordo com temperatura pré-estabelecida (°C). Linha em vermelho indica a entalpia de fusão (J/g).

Os termogramas de DSC das amostras NPSiO_2 (figura 21) e $\text{NPSiO}_2\text{-TS}$ (figura 22) apresentaram curvas calorimétricas semelhantes, ambas apresentando eventos exotérmicos no início, podendo estar associadas a perda de água adsorvida. A partir de 60°C, em ambas amostras se iniciaram eventos endotérmicos de decomposição, cujo pico máximo se dá em 128,49°C na amostra que continha somente sílica (NPSiO_2), e 134,39°C na amostra com sílica e biocompostos veiculados da *Tradescantia spathacea* ($\text{NPSiO}_2\text{-TS}$). A entalpia de fusão na amostra de NPSiO_2 pôde ser calculada em 409,7 J/g (71,38°C), já na amostra de $\text{NPSiO}_2\text{-TS}$ foi de 602,7 J/g (94,64°C), significando que a última amostra citada precisou desprender mais energia para fundir-se, que pode estar relacionado a um maior tamanho de partículas.

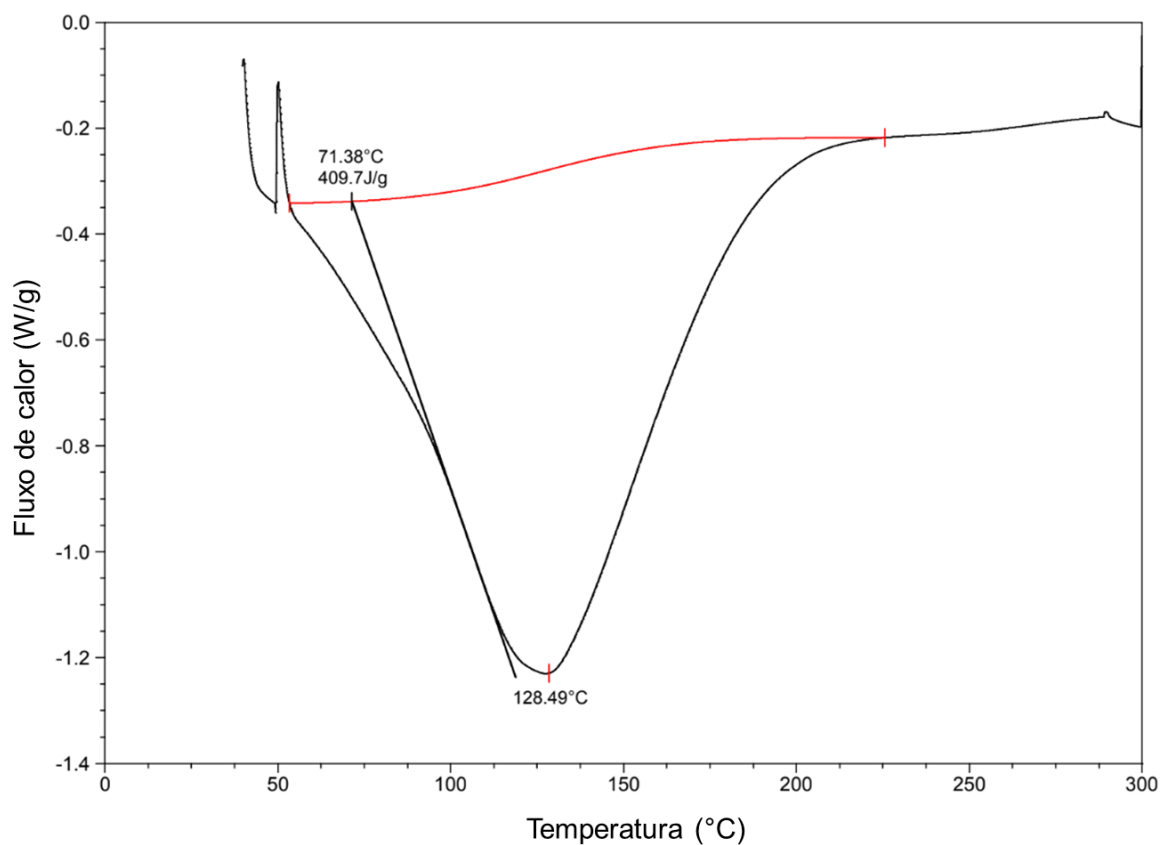


Figura 21: Termograma de DSC da amostra de nanopartículas de sílica (NPSiO₂). Expresso em fluxo de calor (W/g). Linha em vermelho indica a entalpia de fusão (J/g).

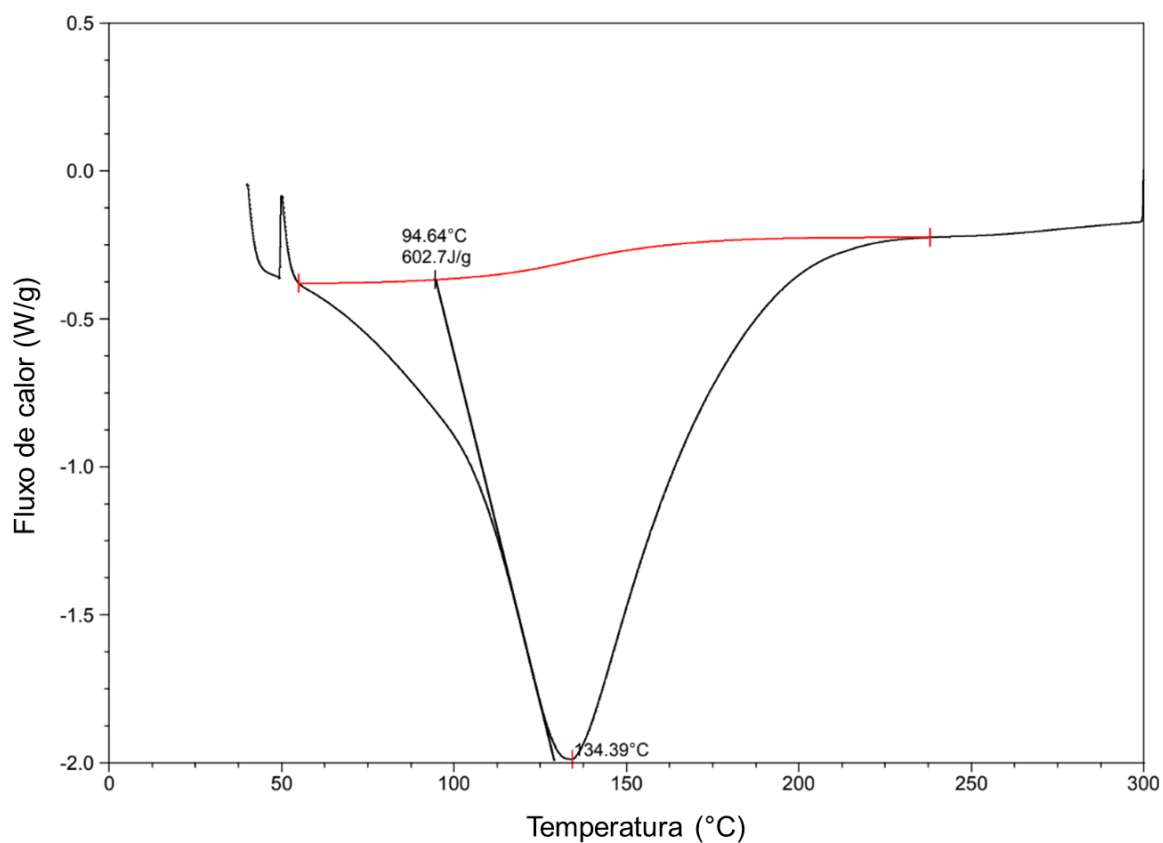


Figura 22: Termograma de DSC da amostra de nanopartículas de sílica veiculadoras de biocompostos de *Tradescantia spathacea* (NPSiO₂-TS). Expresso em fluxo de calor (W/g). Linha em vermelho indica a entalpia de fusão (J/g).

5.2.4 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier

A espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier é realizada para verificar a presença de grupos funcionais na superfície das amostras de EATS, NPSiO₂ e NPSiO₂-TS. A figura 19 e 20 mostram os espectros de FTIR na região de 4000 a 500 cm⁻¹.

O espectro da NPSiO₂ e NTPS apresentam estiramentos semelhantes, que podem ser associados aos grupos funcionais silanóis (Si-OH) e de siloxanos (Si-O-Si). Os silanóis são representados na deformação angular O-H em 1635 cm⁻¹, na banda de estiramento O-H na região entre 3511 a 3089 cm⁻¹ e frequência de estiramento Si-O que absorve em 955 cm⁻¹.

A presença da banda em 3511 a 3089 cm⁻¹ pode ser atribuída ao alongamento O-H que pode ser associada a umidade do ambiente absorvida pela estrutura mesoporosa (amostras NPSiO₂ e NPSiO₂-TS). Nas amostras com o extrato (NPSiO₂-TS e EATS), essa banda mostra maior alongamento, além da água que foi utilizada como solvente, pode estar associada a presença de fenóis. O grupo carbonila pôde ser identificado no estiramento 1655 das amostras NPSiO₂-TS e EATS, este grupo pode corresponder a presença de flavonoides e cumarinas. A ligação aromática C=C absorve na região 1600 a 1450 cm⁻¹ e pode ser visualizada no espectro do EATS.

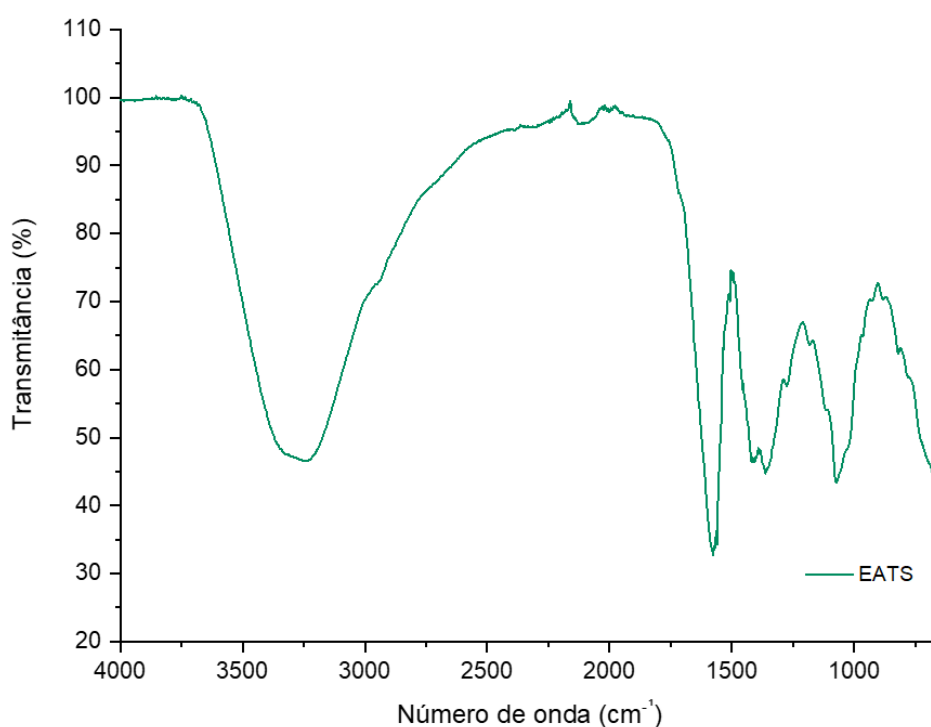


Figura 23: Espectro de FTIR da amostra EATS. Onde EATS = Extrato aquoso de *Tradescantia spathacea*.

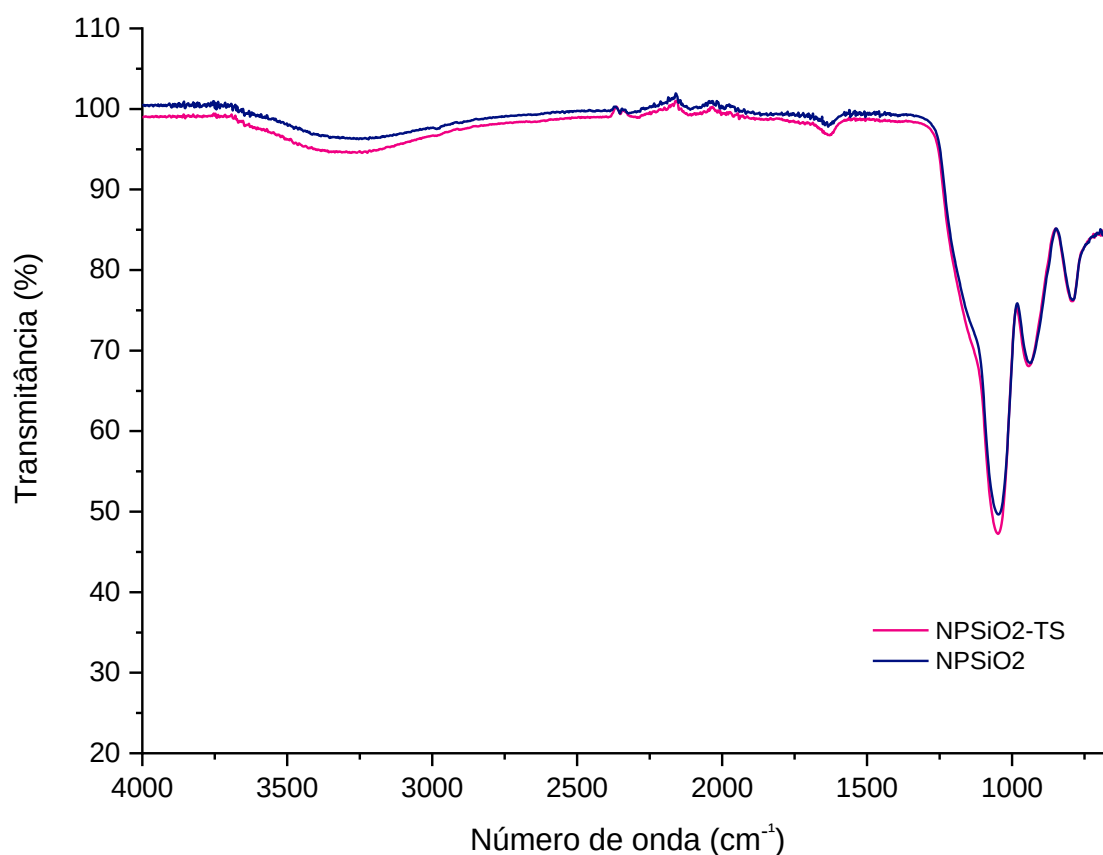


Figura 24: Espectros de FTIR das amostras de NPSiO₂ e NPSiO₂-TS. Onde NPSiO₂ = nanopartículas de sílica; NPSiO₂-TS = nanopartículas de sílica veiculadoras de biocompostos de *Tradescantia spathacea*.

5.3 Análise comportamental

5.3.1 Teste de campo aberto

Para análise dos resultados do *crossing* (figura 21) no teste de campo aberto foi realizada ANOVA de uma via com pós teste de Tukey [$F(3, 22) = 3,861$; $p = 0,0219$], os animais lesionados com a 6-OHDA apresentaram redução significativa nas explorações do aparato em relação ao grupo controle ($p = 0,0372$). Já os animais dos grupos NPSiO₂-TS 10 ($p = 0,8346$) e NPSiO₂-TS 30 ($p = 0,8662$) apresentaram comportamento semelhante ao grupo controle, logo não houve diferença estatística entre eles. Adicionalmente, foi observado aumento significativo no *crossing* do grupo NPSiO₂-TS 30 quando comparado com os animais do grupo 6-OHDA ($p = 0,0085$). Os animais que receberam a toxina por microinjeção intracerebral e tratados com nanopartículas (NPSiO₂-TS 10 e NPSiO₂-TS 30) mostraram médias estatisticamente iguais entre si ($p = 0,4241$).

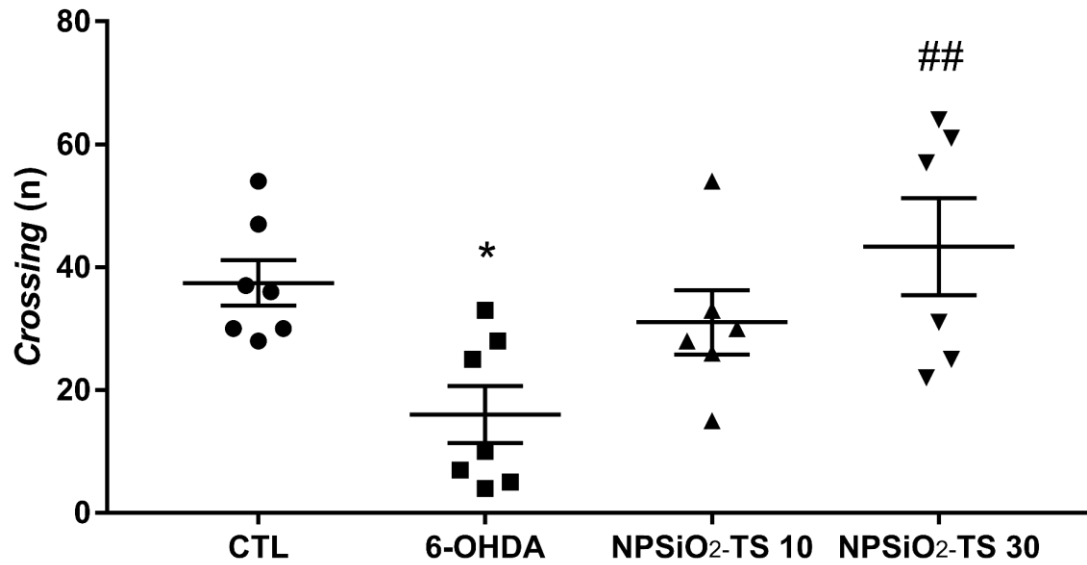


Figura 25: Resultado do teste de campo aberto quanto ao parâmetro de *crossing*, análise por ANOVA de uma via com pós teste de Tukey ($p < 0,05$). Onde CTL = controle; 6-OHDA = 6-hidroxidopamina; NPSiO₂-TS 10 = nanopartículas de sílica veiculadoras de biocompostos de *Tradescantia spathacea* 10 mg/kg; NPSiO₂-TS 30 = nanopartículas de sílica veiculadoras de biocompostos de *Tradescantia spathacea* 30 mg/kg. * significa diferença significativa em relação ao grupo CTL ($p < 0,05$), ## indica diferença significativa em relação ao grupo 6-OHDA ($p < 0,01$).

Quanto ao *rearing* (figura 22) foi realizada análise por Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn ($p = 0,0065$). Foi possível verificar que os animais do 6-OHDA apresentaram diminuição significativa em relação ao grupo controle ($p = 0,0070$). Os animais lesionados e tratados com NPSiO₂-TS apresentaram comportamento semelhante aos animais que não receberam a toxina (Controle vs. NPSiO₂-TS 10, $p = 0,1078$; Controle vs. NPSiO₂-TS 30, $p > 0,9999$), o mesmo ocorreu com os grupos NPSiO₂-TS quando comparados entre si ($p > 0,9999$).

Também não houve diferença significativa entre os grupos NPSiO₂-TS 10 ($p > 0,9999$) e NPSiO₂-TS 30 ($p = 0,2089$) quando comparados ao grupo 6-OHDA.

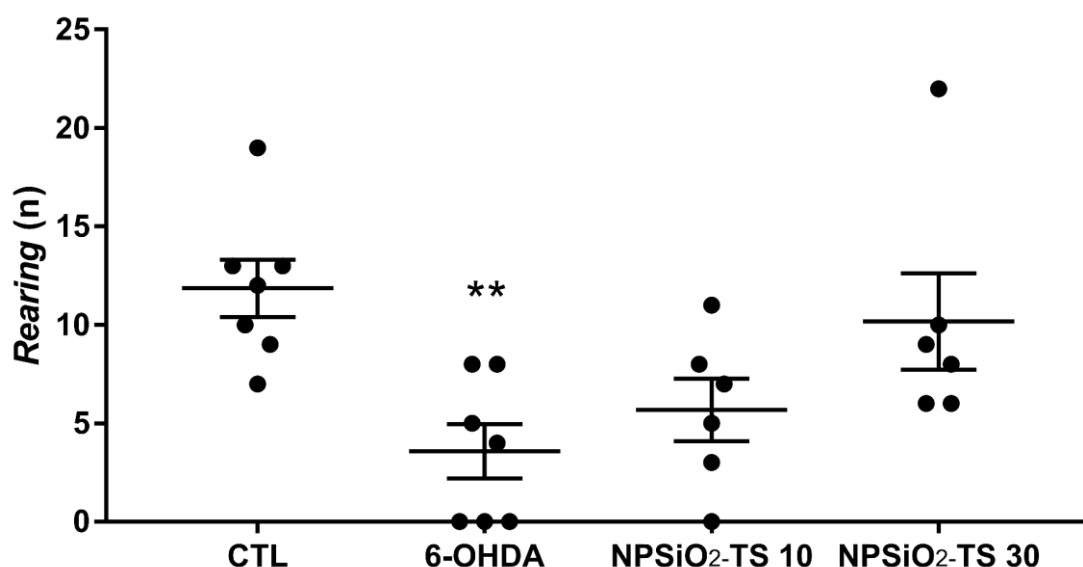


Figura 26: Resultado do teste de campo aberto quanto ao parâmetro de *rearing*, análise por Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn ($p < 0,05$). Onde CTL = controle; 6-OHDA = 6-hidroxidopamina; NPSiO₂-TS 10 = nanopartículas de sílica veiculadoras de biocompostos de *Tradescantia spathacea* 10 mg/kg; NPSiO₂-TS 30 = nanopartículas de sílica veiculadoras de biocompostos de *Tradescantia spathacea* 30 mg/kg. ** indica diferença significativa em relação ao grupo CTL ($p < 0,01$).

Ao analisar a média de eliminação de bolos fecais (figura 23) durante o teste de campo aberto por Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn ($p = 0,0028$), observou-se que os grupos lesionados com toxina e tratados com as NPSiO₂-TS apresentaram comportamento semelhante ao grupo controle ($p > 0,9999$), enquanto os animais do grupo 6-OHDA ($p = 0,0025$) apresentaram um aumento significativo na defecação. Os animais do grupo NPSiO₂-TS 30 apresentaram redução significativa nos bolos fecais em relação ao grupo 6-OHDA ($p = 0,0307$). O grupo NPSiO₂-TS 10 não apresentou diferença estatística quando comparado ao grupo 6-OHDA ($p = 0,3476$), nem ao NPSiO₂-TS 30 ($p > 0,9999$).

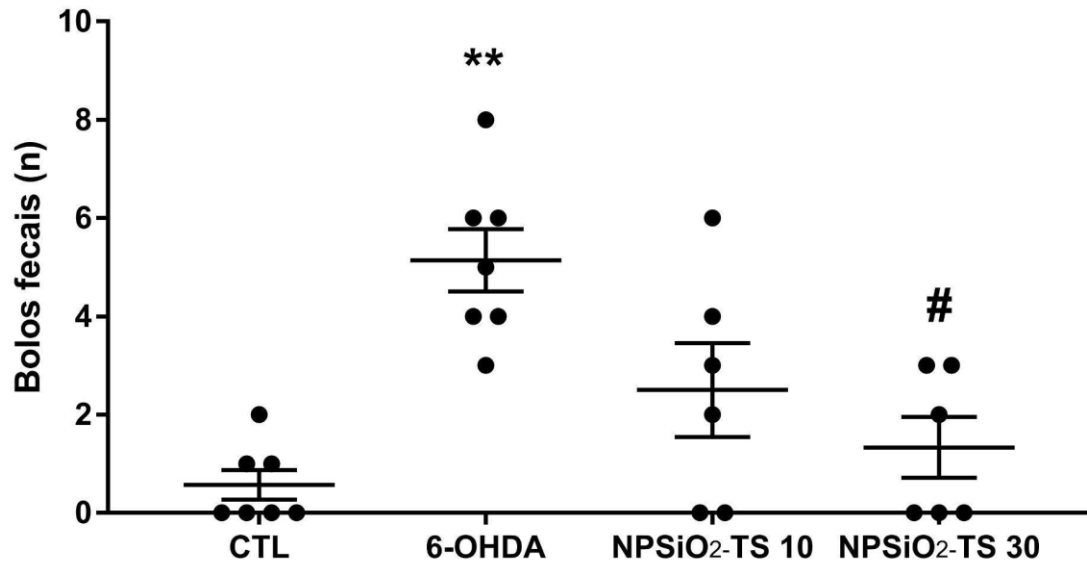


Figura 27: Resultado do campo aberto, considerando os bolos fecais eliminados durante o teste, análise por Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn ($p < 0,05$). Onde CTL = controle; 6-OHDA = 6-hidroxidopamina; NPSiO₂-TS 10 = nanopartículas de sílica veiculadoras de biocompostos de *Tradescantia spathacea* 10 mg/kg; NPSiO₂-TS 30 = nanopartículas de sílica veiculadoras de biocompostos de *Tradescantia spathacea* 30 mg/kg. ** indica diferença significativa em relação ao grupo CTL ($p < 0,01$), # indica diferença significativa em relação ao grupo 6-OHDA ($p < 0,05$).

Para analisar o *grooming* (figura 24) realizado no teste de campo aberto foi feito Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn ($p = 0,0551$), onde não foi observada diferença estatística entre nenhum dos grupos que receberam a toxina intracerebral quando comparado ao grupo que não recebeu a toxina (Controle vs. 6-OHDA, $p > 0,9999$; Controle vs. NPSiO₂-TS 10, $p = 0,1210$; Controle vs. NPSiO₂-TS 30, $p = 0,1210$). Também não foi observado aumento significativo entre os grupos lesionados com 6-OHDA quando comparados entre si ($p > 0,9999$).

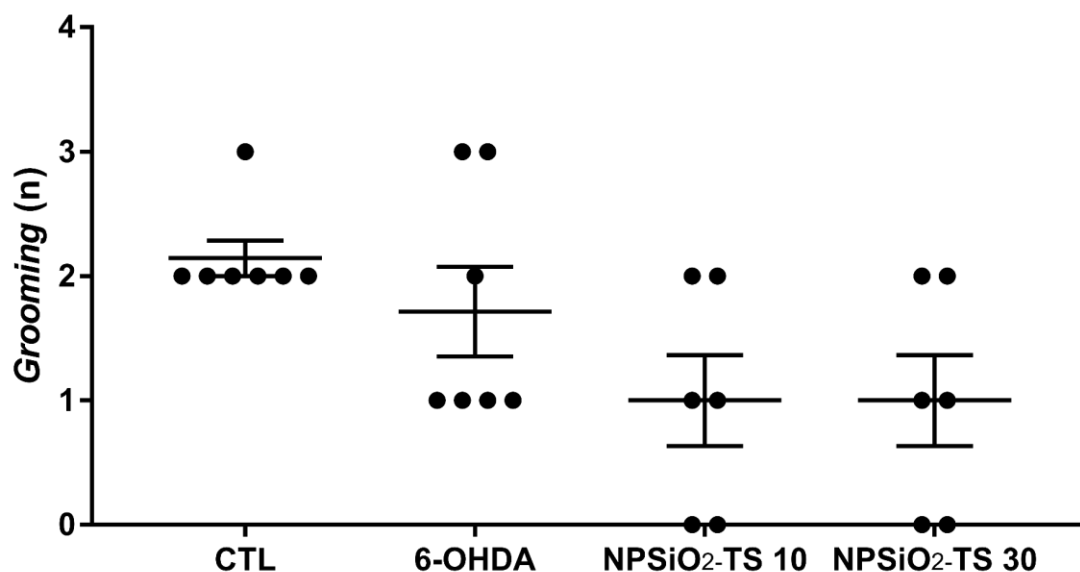


Figura 28: Resultado dos movimentos de *grooming* durante o teste, análise por Kruskal-Wallis com pós teste de Dunn ($p < 0,05$). Onde CTL = controle; 6-OHDA = 6-hidroxidopamina; Onde CTL = controle; 6-OHDA = 6-hidroxidopamina; NPSiO₂-TS 10 = nanopartículas de sílica veiculadoras de biocompostos de *Tradescantia spathacea* 10 mg/kg; NPSiO₂-TS 30 = nanopartículas de sílica veiculadoras de biocompostos de *Tradescantia spathacea* 30 mg/kg.

5.3.2 Teste de cilindro

Com relação às médias das porcentagens de toques contralaterais (%TC), o grupo controle obteve um resultado de 51%, o grupo 6-OHDA de 18,8%, o grupo NPSiO₂-TS 10 de 47,1%, o grupo NPSiO₂-TS 30 de 52,8%.

Para avaliação estatística, foi realizado Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn (figura 25) [$F(3, 22) = 3,493$; $p = 0,0193$], onde foi evidenciada diferença estatística entre os grupos 6-OHDA e CTL ($p > 0,9999$). Não houve diferença estatística entre os demais grupos NPSiO₂-TS 10 ($p > 0,9999$) e NPSiO₂-TS 30 ($p = 0,9990$) quando comparados com os animais do grupo controle. Embora os animais que foram lesionados com 6-OHDA e que receberam tratamento com nanopartículas apresentarem um percentual de toques contralaterais mais elevado do que os animais lesionados e tratados somente com veículo, o aumento destes toques não foi significativo entre estes grupos (6-OHDA vs. NPSiO₂-TS 10, $p = 0,1737$; 6-OHDA vs. NPSiO₂-TS 30, $p = 0,0636$). Também não houve diferença estatística entre os animais tratados com as diferentes doses de nanopartículas ($p > 0,9999$).

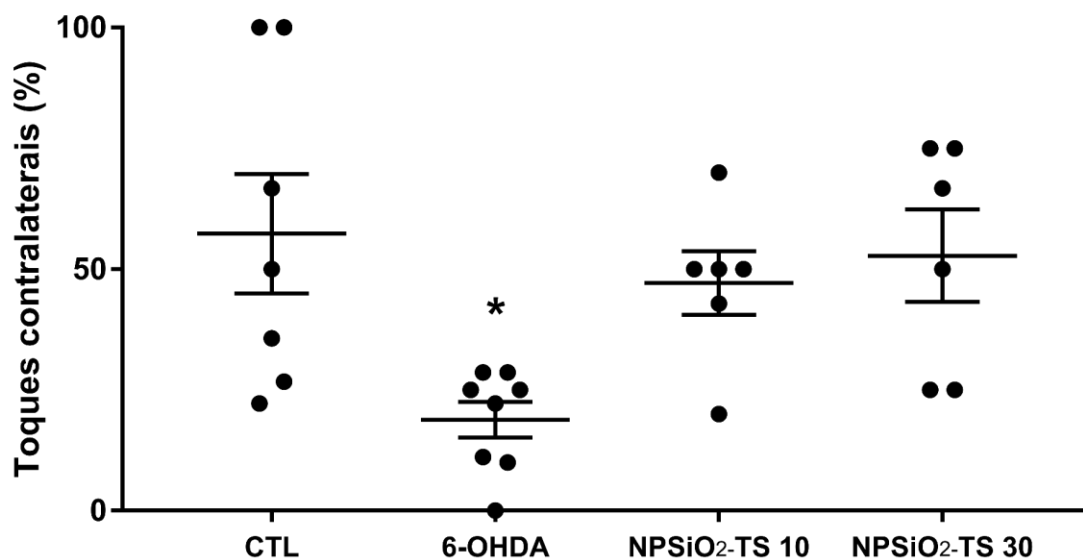


Figura 29: Resultado do teste de cilindro, expresso pela porcentagem de toques contralaterais, análise por Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn ($p < 0,05$). Onde CTL = controle; 6-OHDA = 6-hidroxidopamina; NPSiO₂-TS 10 = nanopartículas de sílica veiculadoras de biocompostos de *Tradescantia spathacea* 10 mg/kg; NPSiO₂-TS 30 = nanopartículas de sílica veiculadoras de biocompostos de *Tradescantia spathacea* 30 mg/kg. * indica diferença significativa em relação ao grupo CTL ($p < 0,05$).

5.4 Análise imunohistoquímica

5.4.1 Preservação de neurônios na SNc

A imunohistoquímica para TH na SNc dos grupos estudados foi avaliada por ANOVA de uma via com pós-teste de Tukey [$F(3, 40) = 59,73$; $p < 0,0001$]. Onde todos os animais lesionados com 6-OHDA apresentaram redução significativa de neurônios em relação ao grupo controle ($p < 0,0001$). Os animais tratados com NPSiO₂-TS 30 apresentaram aumento significativa de neurônios imunorreativos em relação ao grupo 6-OHDA ($p < 0,0001$) e ao NPSiO₂-TS 10 ($p = 0,0016$). Não houve diferença estatística entre os grupos 6-OHDA e NPSiO₂-TS 10 ($p = 0,2310$) e 30 entre si.

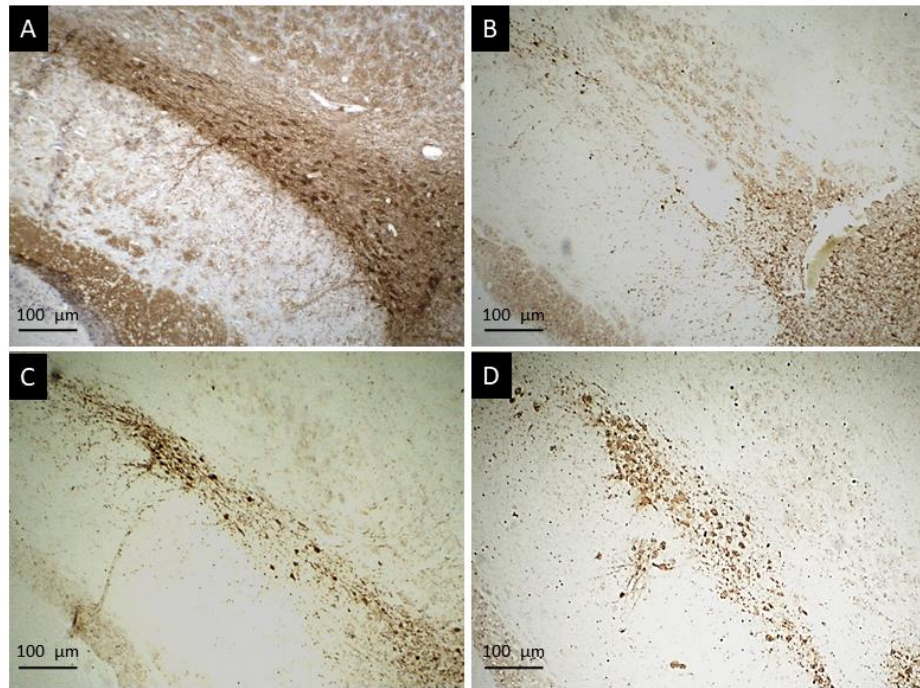


Figura 30: Fotomicrografias (100x) de neurônios imunorreativos para enzima TH na SNc dos animais pertencentes aos grupos controle (A), 6-hidroxidopamina (6-OHDA) (B), nanopartículas de sílica veiculadoras de biocompostos de *Tradescantia spathacea* 10 mg/kg (NPSiO₂-TS 10) (C), nanopartículas de sílica veiculadoras de biocompostos de *Tradescantia spathacea* 30 mg/kg (NPSiO₂-TS 30) (D).

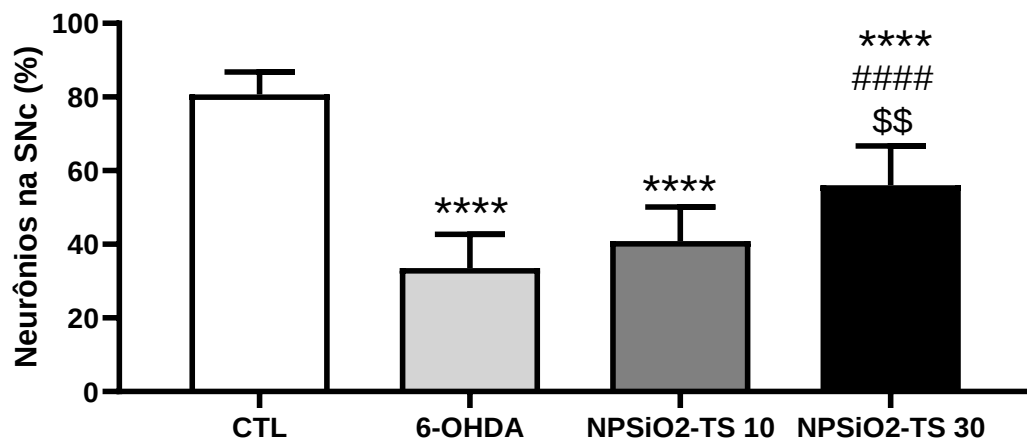


Figura 31: Resultado da quantificação de neurônios imunorreativos presentes em relação ao lado contralateral à lesão, análise por ANOVA de uma via com pós teste de Tukey ($p < 0,05$). As colunas representam as médias e as barras o desvio padrão da média. **** significa diferença em relação ao controle ($p < 0,0001$), #### significa diferença estatística em relação ao 6-OHDA ($p < 0,0001$), \$\$ significa diferença estatística em relação ao NPSiO₂-TS 10 ($p < 0,01$).

5.4.2 Preservação de fibras estriatais

Foi realizada ANOVA com pós teste de Tukey [$F(3, 36) = 5,256$, $p = 0,0041$]. A densidade óptica relativa para TH (figura 27) do núcleo estriado evidenciou redução significativa na porcentagem das fibras positivas TH+ no grupo 6-OHDA ($p = 0,0032$) em relação ao grupo controle. Os animais tratados com NPSiO₂-TS 10 ($p = 0,6403$) e NPSiO₂-TS 30 ($p = 0,8326$) mantiveram a porcentagem de fibras estriatais semelhantes ao grupo controle, não apresentando diferença significativa. Nos animais tratados com NPSiO₂-TS 30 houve aumento significativo em comparação ao grupo 6-OHDA ($p = 0,0295$). Os grupos de NPSiO₂-TS não apresentaram diferença estatística entre si ($p = 0,9863$).

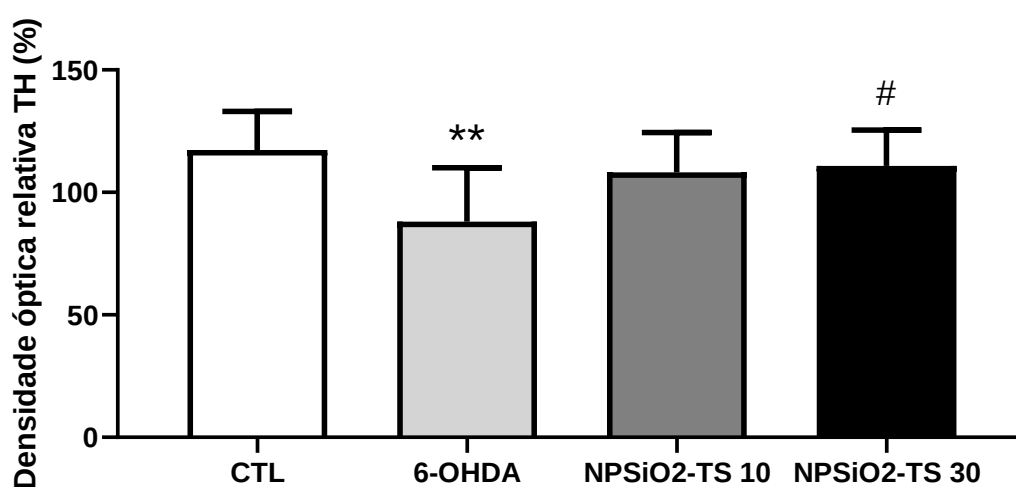


Figura 32: Densidade óptica relativa de fibras estriatais para enzima tirosina-hidroxilase (TH+) no núcleo estriado, em relação ao lado contralateral à lesão, análise por ANOVA de uma via com pós teste de Tukey ($p < 0,05$). As colunas representam as médias e as barras o desvio padrão da média. ** indica diferença significativa em relação ao controle ($p < 0,01$); # indica diferença significativa em relação ao 6-OHDA ($p < 0,05$).

5.4.3 Expressão astrocitária no núcleo estriado

Na figura 28 podem-se visualizar fotomicrografias (400x) do núcleo estriado dos respectivos grupos estudados, onde foram realizadas Kruskal Wallis com pós-teste de Dunn ($p < 0,0001$). Na densidade óptica para GFAP (figura 29) foi observado um aumento significativo de expressão astrocitária nos grupos 6-OHDA ($p < 0,0001$) e NPSiO₂-TS 10 ($p = 0,0026$) em relação ao grupo controle. Os animais tratados com a maior dose de nanopartículas (NPSiO₂-TS 30) apresentaram redução na expressão astrocitária, assemelhando-se ao grupo controle ($p = 0,1839$) e diferindo do grupo 6-OHDA ($p = 0,0313$). Não houve diferença estatística entre os grupos NPSiO₂-TS ($p > 0,9999$).

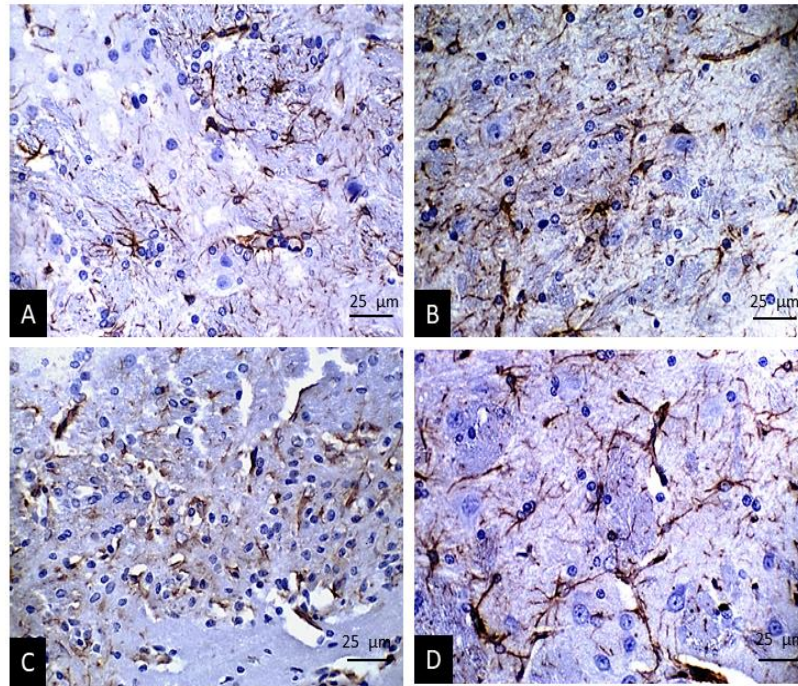


Figura 33: Fotomicrografias (400x) de astrócitos imunorreativos para proteína GFAP no núcleo estriado dos animais pertencentes aos grupos controle (A), 6-hidroxidopamina (6-OHDA) (B), nanopartículas de sílica veiculadoras de biocompostos de *Tradescantia spathacea* 10 mg/kg (NPSiO₂-TS 10) (C), nanopartículas de sílica veiculadoras de biocompostos de *Tradescantia spathacea* 30 mg/kg (NPSiO₂-TS 30) (D).

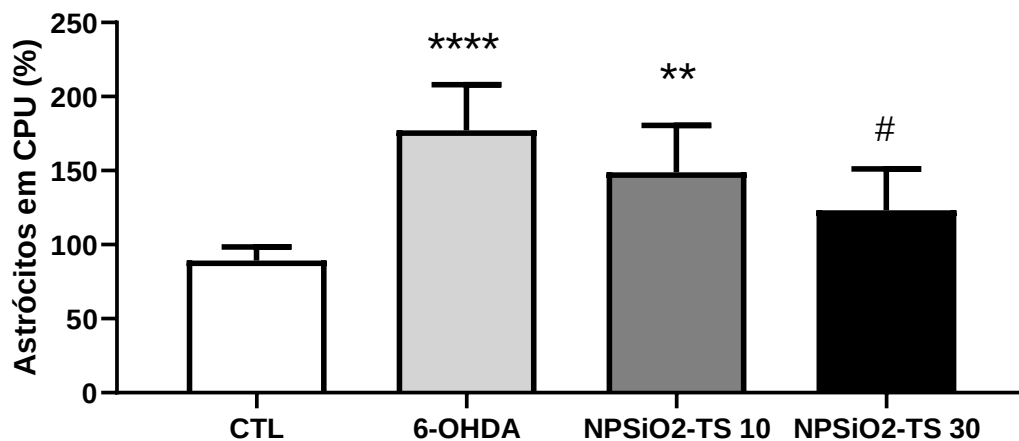


Figura 34: Resultado da quantificação de astrócitos imunorreativos presentes no núcleo estriado, em relação ao lado contralateral à lesão, análise por Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn ($p < 0,05$). As colunas representam as médias e as barras o desvio padrão da média. ** indica diferença significativa em relação ao controle ($p < 0,01$); **** indica diferença significativa em relação ao controle ($p < 0,0001$); # indica diferença significativa em relação ao 6-OHDA ($p < 0,05$).

6 DISCUSSÃO

Nesta pesquisa, a infusão foi a técnica utilizada para obter o extrato aquoso da *Tradescantia spathacea*. Este método convencional está associado a eficácia na obtenção de compostos fenólicos totais presentes no material vegetal (UDUWANA; ABEYNAYAKE; WICKRAMASINGHE, 2023).

A infusão pôde destacar-se no rendimento global, já que o extrato aqui obtido apresentou rendimento global satisfatório ($21,94 \pm 0,43\%$) quando comparado a outros métodos de extração para a mesma espécie vegetal, onde foram relatados rendimentos de 2,8 a 8,37% utilizando-se a técnica de decocção (LUCIANO-MONTALVO *et al.*, 2013; ROSALES-REYES *et al.*, 2008), 17,9% por Soxhlet (MENA-REJON *et al.*, 2009) e 3,4% em secagem por rotaevaporação (SRIWANTHANA *et al.*, 2007).

Tratando-se da obtenção de compostos fenólicos, no EATS foi possível quantificar $16,30 \pm 1,3$ mg/g, corroborando o estudo de García-Varela *et al.* (2015) que em condições semelhantes à deste estudo (infusão com folhas secas) foram encontradas $16,9 \pm 3,7$ mg/g de fenóis. Nota-se que a água aos 100°C, como foi utilizada nesta pesquisa, é capaz de separar mais biocompostos, seja em folhas secas ($8,5 \pm 3,7$ mg/g) ou frescas ($7,5 \pm 1,5$ mg/g). Além disto, a água como solvente proporciona maior obtenção de fenóis na *T. spathacea* quando comparada a outros solventes como metanol ($1,5 \pm 0,7$ mg/g), etanol ($1,6 \pm 0,2$ mg/g), acetona ($5,5 \pm 1,1$ mg/g), éter petrolífero ($1,4 \pm 2,4$ mg/g), clorofórmio ($1,7 \pm 2,5$ mg/g) e hexano ($0,7 \pm 0,01$ mg/g). Este achado corrobora positivamente a pesquisa, visto que esta classe foi de interesse para o desenvolvimento das nanopartículas e posterior aplicação *in vivo* (SANTOS, 2021).

Comparando os flavonoides totais obtidos no EATS ($2,73 \pm 0,79$ mg/g) a pesquisas utilizando o mesmo material vegetal, pôde-se observar que o quantitativo destes compostos foi superior ao extrato metanólico através de ultrassom (0,7 mg/g) obtido por Sánchez-Roque *et al.* (2017) e inferior ao extraído por Tan *et al.* (2014) onde foram utilizados como solventes a acetona aquosa a 70% e o ácido fórmico a 1% (10,8 mg/g), isto pode ser associado aos métodos de extração, solventes e sazonalidade do país onde foi realizada a coleta do material vegetal. Na família Commelinaceae, a *T. spathacea* destaca-se pelo teor de flavonoides totais (Tan *et al.*, 2014), que atuam em sinergismo com outras classes de biocompostos desta herbácea.

O extrato contendo biocompostos desta pesquisa foram veiculados em nanopartículas de sílica, que possuem propriedades físicas variáveis, como morfologia e tamanho de partículas. A morfologia pode ser modificada no momento da síntese, no entanto o aspecto esférico foi encontrado em diferentes sínteses, seja por secagem em estufa (ABOMUGHAID, 2022), micro-ondas ou autoclave (OLIVEIRA *et al.*, 2020). Quanto ao diâmetro, a análise de Matussin *et al.*, (2020) constatou que os compostos químicos da *T. spathacea* influenciam no

processo de formação das partículas, assim como o método de síntese tem ligação direta com o tamanho das partículas. Também foi verificado que a concentração do extrato da *T. spathacea* é inversamente proporcional ao tamanho das NP, ou seja, uma alta concentração do material vegetal proporciona supressão do crescimento das NP.

Isto pode justificar a discrepância entre os diâmetros das NPSiO₂-TS, visto que foi utilizado uma baixa concentração de EATS na síntese (15 mg/mL). No entanto, foram formadas partículas a partir de 30 nm, o que significa um achado positivo comparado com o estudo de Matussin *et al.*, (2020) que formulou NP abaixo de 100 nm utilizando o extrato de *T. spathacea*. Já Abomughaid (2022) em seu estudo com NPSiO₂ veiculando extrato aquoso de casca de laranja conseguiu obter partículas com diâmetros médios de 20 nm.

Sabe-se que o diâmetro médio das nanopartículas é uma característica importante quando o objetivo é atravessar a barreira hematoencefálica, onde o ideal é que seja de até 100 nm (BHARADWAJ *et al.*, 2016). No entanto, o estudo de Lungare *et al.*, (2016) realizou a obtenção de NPSiO₂ com compostos naturais (curcumina e crisina) para tratamento da doença de Alzheimer com administração por via intranasal, onde as NPSiO₂ abaixo de 500 nm mostraram-se carreadoras fitoquímicas eficazes na entrega medicamentosa ao cérebro, sendo capazes de serem captadas por células olfativas.

As amostras foram submetidas a avaliação de termogravimetria, visto que alguns biocompostos podem ser mais sensíveis à degradação térmica. Os achados obtidos corroboram o estudo de Ciobanu *et al.*, (2019), que também encontrou uma maior decomposição térmica nos extratos puros (42 e 48%) quando comparado ao extrato associado à sílica mesoporosa, onde as curvas de TG evidenciaram uma perda de massa de 21 a 41%. No estudo de Abomughaid (2022) foi realizada análise térmica de nanopartículas de sílica veiculadoras de biocompostos de material vegetal (casca de laranja) também aconteceu degradação térmica semelhante, onde a degradação iniciou em aproximadamente 50°C por conter extrato aquoso, assim como as amostras com EATS e NPSiO₂-TS, no entanto foi perdido cerca de 30% de massa, quase o dobro da perda da NPSiO₂-TS.

Na análise de calorimetria, nota-se que a sílica apresentou eventos endotérmicos, ou seja, absorveu calor do entorno, com pico na faixa de aproximadamente 130°C, corroborando os achados de Chaudhary; Rohilla; Mehta (2014), onde foram avaliadas nanopartículas de sílica em pó calcinadas e não calcinadas, ambas apresentaram termogramas de DSC semelhantes ao do presente estudo, com evento endotérmico em aproximadamente 120°C. Comparando a entalpia de fusão das NPSiO₂ com a das NPSiO₂-TS, percebe-se que a amostra com os biocompostos da *T. spathacea* precisou desprender mais energia para fundir-se, corroborando os achados do MEV, indicando que estas possuíam maior discrepância entre os tamanhos de partículas.

Quanto aos grupos funcionais presentes, nas amostras contendo sílica (NPSiO₂ e NPSiO₂-TS) já era esperado que nos espectros fossem encontradas bandas de silanóis e siloxanos (OLIVEIRA *et al.*, 2020). Nas amostras contendo os biocompostos da *T. spathacea* (NPSiO₂-TS e EATS), foram encontradas bandas que podem ser associadas à presença de fenóis, flavonoides e cumarinas (ESTRADA *et al.*, 2021). Estes grupos de compostos bioativos já haviam sido identificados na amostra de EATS (SANTOS, 2021).

É válido ressaltar que as classes de biocompostos supracitadas podem estar associadas aos achados comportamentais nesta pesquisa, visto que estes compostos foram associados à atividade antioxidante devido ao aumento dos antioxidantes exógenos, como a SOD, glutathione e catalase (HUSSEIN *et al.*, 2018). Além disso, em estudo prévio, o EATS apresentou capacidade inibitória de 50% (IC₅₀) de 16,7 ± 1,9 µg/mL, e na concentração máxima testada (100 ppm), o EATS foi capaz de inibir 81,3% dos radicais livres (LOPES, 2019).

Nesta pesquisa, os animais que receberam 6-OHDA via intracerebral no procedimento cirúrgico ainda apresentavam redução da locomoção espontânea no teste de campo aberto, realizado no 10º dia após a estereotaxia, indicando déficits motores provocados pela indução do modelo animal para estudo da doença de Parkinson através da toxina supracitada (TRIGO-DAMAS *et al.*, 2018). Além disso, os animais lesionados com a 6-OHDA que receberam tratamento diário de NPSiO₂-TS 30 mg/kg apresentaram aumento significativo no *rearing*. Tal achado é sugestivo de ação neuroprotetora.

O teste de campo aberto além de possibilitar avaliação funcional, permite mensurar comportamentos ansiosos no animal (SU *et al.*, 2018). O número de bolos fecais é um parâmetro para avaliar ansiedade (WALSH; CUMMINS, 1976). Dessa forma, pode-se observar que o aumento significativo na defecação dos animais do grupo 6-OHDA em relação ao grupo controle indica um maior nível de ansiedade em função da lesão, e sugere-se que as NPSiO₂-TS em 30 mg/kg apresentaram efeito ansiolítico devido à redução significativa dos bolos fecais em relação ao grupo 6-OHDA.

Em estudo prévio, o EATS em dose de 100 mg/kg havia apresentado efeito sedativo (diminuição dos parâmetros de ansiedade, mas também da atividade motora) quando comparado ao grupo 6-OHDA (LOPES, 2024). No presente trabalho, observou-se diminuição no parâmetro de ansiedade (bolos fecais), sem comprometimento da atividade motora espontânea. Além disto, a *T. spathacea* está listada como uma das plantas medicinais utilizadas para tratamento de ansiedade e depressão no México, país onde é amplamente utilizada e estudada (GUTIERREZ *et al.*, 2014).

A atividade ansiolítica pode estar associada a presença da fraxetina, uma cumarina, que além de atuar em mecanismo anti-inflamatório mediando expressão de interleucinas (IL-1β, IL-6), TNF-α, óxido nítrico e micróglia, foi associada a atenuação de comportamento ansioso e depressivo *in vivo* (DENG *et al.*, 2022; AHMED *et al.*, 2023). Outro biocomposto que

pode estar associado a redução de bolos fecais nesta pesquisa é o vicianin-2, um flavonoide presente na *T.spathacea* e marjoritário da *Passiflora edulis* que foi relacionado a ação antioxidante (ALVES *et al.*, 2020) e antidepressiva, atuando em sinergia com demais compostos (RETAMOZO *et al.*, 2023).

Na avaliação do teste do cilindro, os toques contralaterais espontâneos podem ser utilizados como indicador da extensão da lesão cerebral, pois o membro contralateral à lesão será afetado. O déficit motor manifestado no toque contralateral relaciona-se a depleção dopaminérgica no núcleo estriado e ação da via indireta dos núcleos da base, onde os estímulos GABAérgicos para o Gpe aumentam, desinibindo o NST e mantendo o córtex motor inibido. Em consequência há redução na iniciação dos movimentos contralaterais (FERRAZOLI *et al.*, 2018).

Diante disto, um animal que foi exposto a lesão da via nigroestriatal e no teste de cilindro apresenta porcentagem de toques contralaterais igual ou maior a 50% pode ser considerado saudável (BOIX *et al.*, 2015). Os animais tratados com NPSiO₂-TS apresentaram comportamento semelhante ao dos animais não lesionados (controle 51%, NPSiO₂-TS 10 47,1% e NPSiO₂-TS 30 52,8%). Já os animais que receberam a toxina e foram tratados com veículo apresentaram maior dificuldade em realizar os toques contralaterais, apresentando uma porcentagem de 18,8% destes movimentos.

Neste experimento, a lesão por 6-OHDA foi realizada no lado direito do núcleo estriado, então, assim como na literatura, nos grupos com maior a extensão da lesão o animal optou pelo uso do membro dianteiro direito, logo apresentaram menor %TC (KAINDLSTORFER *et al.*, 2019). O contrário também aconteceu nos grupos tratados (e, possivelmente, com menor extensão da lesão), os animais tiveram preferência de utilizar a pata esquerda e a %TC se elevou (ANTIPOVA *et al.*, 2017). O grupo tratado com NPSiO₂-TS 30 mg/kg apresentou %TC acima de 50% (de maneira similar ao grupo controle), podendo ser considerado saudável.

Também foi observada perda significativa de neurônios na SNpc e de fibras dopaminérgicas no núcleo estriado dos animais que foram induzidos com 6-OHDA e tratados apenas com NPSiO₂, este achado contribui para efetividade do modelo experimental a partir da lesão da via nigroestriatal (WANG *et al.*, 2017). Por ser uma lesão progressiva, a depleção de neurônios dopaminérgicos pode evoluir até 28 dias (DA SILVA *et al.*, 2016).

Concomitante a isto, os animais lesionados com a 6-OHDA apresentaram aumento na cascata neuroinflamatória, evidenciado pelo aumento na expressão astrocitária mesmo após 15 dias de procedimento cirúrgico, e poderia ser observado até 4 semanas (MORI *et al.*, 2017). A disfunção astrocitária pode resultar em déficit no combate aos radicais livres e no suporte metabólico e estrutural dos neurônios dopaminérgicos, que possuem tempo de vida reduzido após a administração da 6-OHDA (KUTER *et al.*, 2018).

Os animais com lesão induzida por 6-OHDA e tratados diariamente com NPSiO₂-TS nas doses de 10 e 30 mg/kg apresentaram recuperação significativa de neurônios na SNc,

preservação de fibras positivas TH+ e redução da expressão astrocitária no núcleo estriado. Esses achados corroboram os de Lopes (2024), onde foram encontradas atenuação da extensão de perda neuronal e da resposta astrocitária nos animais tratados com o EATS nas doses de 10, 30 e 100 mg/kg, onde a maior dose proporcionou maior neuroproteção, no entanto ocorreu efeito sedativo nos animais, ação esta que presente estudo objetivava cessar. Esses achados são sugestivos que o mecanismo de ação das NPSiO₂-TS frente a lesão da via nigroestriatal por 6-OHDA envolve atividade anti-neuroinflamatória. Isto pode ser atribuído, inclusive, aos biocompostos encontrados em sua composição química (LOPES, 2024).

Entre os ácidos fenólicos identificados anteriormente pelo grupo de pesquisa no EATS, o ácido cafeico e o ácido p-cumárico foram relacionados a proteção de células neuronais (PC-12) contra citotoxicidade e prevenção de apoptose por estresse oxidativo (GAO *et al.*, 2020). O ácido cafeico atua reduzindo expressão astrocitária e de mediadores inflamatórios, além de proteger neurônios dopaminérgicos e déficits motores (ZHANG *et al.*, 2019).

Em modelo *in vivo* para estudo da doença de Parkinson induzido por rotenona e tratado com ácido cafeico, os animais apresentaram atenuação dos déficits motores, além de menor expressão microglial e de mediadores inflamatórios, como a óxido nítrico-sintase induzida (iNOS), ciclo-oxigenase-2 (COX-2) e fator nuclear kappa B (NFκB) (ZAITONE *et al.*, 2019).

O ácido verátrico, um ácido fenólico também identificado no EATS, atua com mecanismo anti-inflamatório, regulando a expressão de IL-6 e óxido nítrico, aumentando antioxidantes endógenos como SOD, CAT e GSH, consequentemente atenuando o estresse oxidativo e a apoptose (SARAVANAKUMAR; RAJA, 2011; CHOI *et al.*, 2012; YU *et al.*, 2021). O vestitol modula ativação de NF-κB, consequentemente atuando na expressão de interleucinas (IL-1β e IL-1α) (BUENO-SILVA *et al.*, 2022).

Os compostos bioativos presentes na *T. spathacea* podem ter minimizado possíveis eventos celulares relacionados a toxicidade pulmonar da sílica, como apoptose celular e aumento de TNF-α, IL-1αβ e IL-6. Embora na literatura percebe-se que as atenções sejam mais voltadas à toxicidade *in vivo* por sílica cristalina, e não sílica amorfa, reconhece-se a sílica por via intranasal em doses elevadas (2,6 a 27 mg / m³) e longa duração (28 a 90 dias) pode ocasionar respostas inflamatórias, morte celular e fibrose pulmonar (DA SILVA *et al.*, 2022). Embora o tratamento tenha sido realizado por 15 dias e em doses menores (10 e 30 mg/kg), reconhece-se que estudos mais direcionados serão necessários, sendo esta uma limitação da pesquisa e perspectiva de continuidade.

7 CONCLUSÃO

Diante do exposto, pôde-se verificar que a infusão foi um bom método de obtenção de compostos bioativos, obtendo-se um quantitativo satisfatório de compostos fenólicos e flavonoides totais no EATS quando comparado com a literatura. Na morfologia das NP, embora tenham sido observados aglomerados de EATS, foram formadas partículas de diâmetro satisfatório para captação neuronal. Além disso, percebe-se que houve veiculação de extrato nas NPSiO₂-TS, confirmada presença de grupos carboxila e hidroxila no NPSiO₂-TS, além dos grupos silanóis, siloxanos. Pôde-se constatar também que a sílica mesoporosa tornou o EATS mais estável à exposição térmica, evidenciada pela pequena perda de massa da NPSiO₂-TS quando comparada ao EATS, sugerindo menor degradação de compostos bioativos.

Na avaliação *in vivo*, observou-se melhora funcional em testes comportamentais após a lesão da via nigroestriatal no grupo tratado com NPSiO₂-TS30 mg/kg, indicando um efeito neuroprotetor das NP. Em acréscimo, a dose de NPSiO₂-TS 30 apresentou efeito ansiolítico, mas não foi sedativo. O tratamento com NPSiO₂-TS30 proporcionou proteção de neurônios dopaminérgicos, preservação de fibras estriatais e atenuação de expressão astrocitária.

Portanto, as nanopartículas de sílica mesoporosa veiculadoras de *T. spathacea* na dose de 30 mg/kg apresentaram efeito neuroprotetor frente à lesão da via nigroestriatal neste modelo pré-clínico para o estudo da DP.

REFERÊNCIAS

- ABOMUGHAI, M.M. Bio-Fabrication of Bio-Inspired Silica Nanomaterials from Orange Peels in Combating Oxidative Stress. *Nanomaterials* 2022; 12(18): 3236.
- AHMED, Z.; TOKHI, A.; ARIF, M.; REHMAN, N.U.; SHEIBANI, V.; RAUF, K.; SEWELL, R.D.E. Fraxetin attenuates disrupted behavioral and central neurochemical activity in a model of chronic unpredictable stress. *Front Pharmacol.* 2023; 23(14): 1135497
- ALMUTAIRI, M.M.; ALANAZI, W.; ALSHAMMARI, M.U.A.; ALOTAIBI, M.R.; ALHOSHANI, A.R., AL-REJAIE.; S.S. Neuro-protective effect of rutin against Cisplatin-induced neurotoxic rat model. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 2017; 17:472.
- ALSAAD, A.M.; AL-BATAINEH, Q.M.; TELFAH, M. Optical properties and photo-isomerization processes of PMMA–BDK–MR nanocomposite thin films doped by sílica nanoparticles. *Polymer Bulletin* 2021; 78, 3425–3441.
- ALVES, J.S.F.; SILVA, A.M.D.S.; DA SILVA, R.M.; TIAGO, P.R.F.; DE CARVALHO, T.G.; DE ARAÚJO JÚNIOR, R.F.; DE AZEVEDO, E.P.; LOPES, N.P.; FERREIRA, L.D.S.; GAVIOLI, E.C. In Vivo Antidepressant Effect of *Passiflora edulis f. flavicarpa* into Cationic Nanoparticles: Improving Bioactivity and Safety. *Pharmaceutics* 2020, 12(4): 383.
- ANTIPOVA, V.A.; HOLZMANN, C.; SCHMITT, O.; WREE, A.; HAWLITSCHKA, A. Botulinum Neurotoxin an Injected Ipsilaterally or Contralaterally into the Striatum in the Rat 6-OHDA Model of Unilateral Parkinson's Disease Differently Affects Behavior. *Frontiers in Behavioral Neuroscience* 2017; 11(119): 1-17.
- ARMSTRONG, M.J.; OKUN, M.S. Diagnosis and Treatment of Parkinson Disease: A Review. *JAMA* 2020; 323(6):548–560
- ATTIA, M.S.; YAHYA, A. MONAEM, N.A.; SABRY, S.A. Mesoporous silica nanoparticles: Their potential as drug delivery carriers and nanoscavengers in Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Saudi Pharm J.* 2023; 31(3):417-432
- BACH, J.P.; RIEDEL, O.; KLOTSCH, J.; SPOTTKE, A.; DODEL, R.; WITTCHEN, H.U. Impact of complications and comorbidities on treatment costs and health-related quality of life of patients with Parkinson's disease. *Journal of the Neurological Sciences* 2012; 314: 41-47.
- BANJERDTEERAKUL, K.; VAS-UMNUAY, P.; PAVARAJARN, V. Synthesis of mesoporous tin dioxide via sol-gel process assisted by resorcinol–formaldehyde gel. *Particuology* 2018; 37: 26-32.
- BARBOSA, A.M.; SANTOS, K.S; BORGES, G.R.; MUNIZ, A.V.C.S.; MENDONÇA, F.M.R.; PINHEIRO, M.S.; FRANCESCHI, E.; DARIVA, C.; PADILHA, F.F. Separation of antibacterial biocompounds from *Hancornia speciosa* leaves by a sequential process of pressurized liquid extraction. *Separation and Purification Technology* 2019; 222: 390–395.
- BASHARZAD, S.F.; HAMIDI, M.; MALEKI, A.; KARAMI, Z.; MOHAMADPOUR, H.; ZANJANI, M.R.S. Polysorbate-coated mesoporous silica nanoparticles as an efficient carrier for improved rivastigmine brain delivery. *Brain Research* 2022; 1781: 147786.
- BHARADWAJ, V.; LIFSHITZ, J.; ADELSON, P. *et al.* Temporal assessment of nanoparticle accumulation after experimental brain injury: Effect of particle size. *Sci Rep* 6, 29988 (2016). <https://doi.org/10.1038/srep2998>
- BISWAS, K.; ALEXANDER, K.; FRANCIS, M.M. Reactive Oxygen Species: Angels and Demons in the Life of a Neuron. *NeuroSci.* 2022; 3(1):130-145.

BLOEM, B.R.; OKUN, M.S.; KLEIN, C. Parkinson's disease. *The Lancet*, 2021; 397 (10291): 2284-2303.

BOIX, J.; PADEL, T.; PAUL, G. A partial lesion model of Parkinson's disease in mice-Characterization of a 6-OHDA-induced medial forebrain bundle lesion. *Behavioural Brain Research* 2015; 284: 196-206.

BOOTH, H.D.E; HIRST, W.; WADE-MARTINS, R. The Role of Astrocyte Dysfunction in Parkinson's Disease Pathogenesis. *Trends in Neurosciences*, 2017; 40(6): 358-370.

BOSTAN, A.C.; STRICK, P.L. The basal ganglia and the cerebellum: nodes in an integrated network. *Nat Rev Neurosci.* 2018;19(6): 338-350

BUENO-SILVA, B.; BUENO, M.R.; KAWAMOTO, D.; CASARIN, R.C.; PINGUEIRO, J.M.S.; ALENCAR, S.M.; ROSALEN, P.L.; MAYER, M.P.A. Anti-Inflammatory Effects of (3S)-Vestitol on Peritoneal Macrophages. *Pharmaceuticals*. 2022; 15(5):553

CARUCCI, C.; SCALAS, N.; PORCHEDDU, A.; PILUDU, M.; MONDUZZI, M.; SALIS, A. Adsorption and Release of Sulfamethizole from Mesoporous Silica Nanoparticles Functionalised with Triethylenetetramine. *Int J Mol Sci.* 2021; 22(14): 7665.

CHAUDHARY, S.; ROHILLA, D.; MEHTA, S. Surfactant adsorption and aggregate structure of silica nanoparticles: A versatile stratagem for the regulation of particle size and surface modification. *Materials Research Express*. 2014; 1: 15011.

CHIA, S.J.; TAN, E.K.; CHAO, Y-X. Historical Perspective: Models of Parkinson's Disease. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020; 21(7): 2464.

CHOI, W-S.; SHIN, P-G.; LEE, J.H.; KIM, G-D. The regulatory effect of veratric acid on NO production in LPS-stimulated RAW264.7 macrophage cells. *Cellular Immunology*, 2012; 280(2): 164-170.

CIOBANU, M.; PIRVU, L.; PAUN, G.; SAVIN, S.; ALBU, B.-G.; MUNTEANU, C.; CUSU, J.P.; ATKINSON, I.; CULITA, D.C.; PETCU, G.; PARVULESCU, V. Development of a new (bio)hybrid matrix based on *Althaea officinalis* and *Betonica officinalis* extracts loaded into mesoporous silica nanoparticles for bioactive compounds with therapeutic applications. *Journal of Drug Delivery Science and Technology* 2019;51, 605-613.

DA SILVA, T.P.; POLI, A.; HARA, D.B.; TAKAHASHI, R.N. Time course study of microglial and behavioral alterations induced by 6-hydroxydopamine in rats. *Neuroscience Letters* 2016; 622: 83-87.

DA SILVA, V.M.; BENJDIR, M.; MONTAGNE, P.; PAIRON, J-C.; LANONE, S.; ANDUJAR, P. Pulmonary Toxicity of Silica Linked to Its Micro- or Nanometric Particle Size and Crystal Structure: A Review. *Nanomaterials*. 2022; 12(14):2392

DAROI, P.A.; DHAGE, S.N.; JUVEKA, A.R. p-Coumaric acid mitigates lipopolysaccharide induced brain damage via alleviating oxidative stress, inflammation and apoptosis, *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 2022; 74(4): 556–564.

DENG, S.J.; GE, J.W.; XIA, S.N.; ZOU, X.X.; BAO, X.Y.; GU, Y.; XU, Y.; MENG, H.L. Fraxetin alleviates microglia-mediated neuroinflammation after ischemic stroke. *Ann Transl Med*, 2022; 10(8): 439

DOLRAHMAN, N.; MUKKHAPHROM, W.; SUTIREK, J.; THONG-ASA, W. Benefits of p-coumaric acid in mice with rotenone-induced neurodegeneration. *Metab Brain Dis.* 2023; 38:373–382.

DORSEY, E.R.; SHERER, T.; OKUN, M.S.; BLOEM, B.R. The Emerging Evidence of the Parkinson Pandemic. *Journal of Parkinson's Disease* 2018; 8, 3–8.

SANTOS, A.M.G. Avaliação do efeito neuroprotetor do extrato aquoso da *Tradescantia spathacea* sobre a lesão medular em roedores. Dissertação (Mestrado em Saúde e Ambiente) - Universidade Tiradentes. Sergipe. p.72. 2021

ELSWORTH, J.D. Parkinson's disease treatment: past, present, and future. *J Neural Transm*, 2020; 127, 785–791.

ESTRADA-HERNÁNDEZ, G.V.; FIGUEROA-RAMÍREZ, S.J.; SIERRA-GRAJEDA, J.M.T.; AGUILAR-UCÁN, C.A. Chapter 7 Obtaining and characterization of the ethanolic extract of the leaves of the *Tradescantia Spathacea* SW. CIERMMI Women in Science TXIV Biology, Chemistry and Life Sciences. Handbooks-©ECORFAN-México, Querétaro, 2021.

FAN, X.; FAN, Z.; YANG, Z.; HUANG, T.; TONG, Y.; YANG, D.; MAO, X.; YANG, M. Flavonoids - Natural Gifts to Promote Health and Longevity. *International Journal of Molecular Sciences* 2022; 23(4):2176.

FERRAZZOLI, D.; ORTELLI, P.; MADEO, G.; GILADI, N.; PETZINGER, G.M.; FRAZZITTA, G. Basal ganglia and beyond: The interplay between motor and cognitive aspects in Parkinson's disease rehabilitation. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 2018; 90: 294-308.

FERREIRA, J.J.; LEES, A.J.; POEWE, W.; RASCOL, O.; ROCHA, J-F.; KELLER, B.; SILVA, P.S. *Neurology* 2018; 90 (21) e1849-e1857;

GAO, H.; YUAN, X.; WANG, Z.; GAO, Q.; YANG, J.; Profiles and neuroprotective effects of *Lycium ruthenicum* polyphenols against oxidative stress-induced cytotoxicity in PC12 cells, *Journal of Food Biochemistry* 2020; 44.

GARCÍA-VARELA, R.; GARCÍA-GARCÍA, R.M.; BARBA-DÁVILA, B.A.; FAJARDO-RAMÍREZ, O.R.; SERNA-SALDÍVAR, S.O.; CARDINEAU, G.A. Antimicrobial Activity of *Rhoeo discolor* Phenolic Rich Extracts Determined by Flow Cytometry. *Molecules* 2015; 20(10): 18685-18703.

GBD. Global, regional, and national burden of 12 mental disorders in 204 countries and territories, 1990-2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. *The Lancet Psychiatry*, 2022. 9(2): 137-150.

GONZÁLEZ-AVILA, M.; ARRIAGA-ALBA, M.; DE LA GARZA, M.; HERNÁNDEZPRETELÍN, M.D.C.; DOMÍNGUEZ-ORTÍZ, M.A.; FATTEL-FAZENDA, S.; VILLA-TREVIÑO, S. Antigenotoxic, antimutagenic and ROS scavenging activities of a *Rhoeo discolor* ethanolic crude extract. *Toxicol In Vitro*. 2003; 17(1): 77-83.

GOSCIANSKA, J.; OLEJNIK, A.; NOWAK, I. APTES-functionalized mesoporous silica as a vehicle for antipyrine-adsorption and release studies. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 2017; 533:187-196.

GUTIÉRREZ, S.L.G.; CHILPA, R.R.; JAIME, H.B. Medicinal plants for the treatment of “nervios”, anxiety, and depression in Mexican Traditional Medicine. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 2014; 24(2014): 591-608.

GÚZMAN-RUIZ, M.A.; LA MORA, M.B.; TORRES, X.; MEZA, C.; GARCÍA, E.; CHAVARRÍA, A. Oral Silica Nanoparticles Lack of Neurotoxic Effects in a Parkinson's Disease Model: A Possible Nanocarrier? *IEEE Transactions on NanoBioscience* 2019; 18(4): 535-541.

HAYES, M.T. Parkinson's Disease and Parkinsonism. *The American Journal of Medicine*, 2019; 132(7): 802-807.

HOON, M.; PETZER, J.P.; VILJOEN, F.; PETZER, A. The Design and Evaluation of an L-Dopa–Lazabemide Prodrug for the Treatment of Parkinson’s Disease. *Molecules* 2017; 22(12), 1-19.

HUSSEIN, R.M.; MOHAMED, W.R.; OMAR H.A. A neuroprotective role of kaempferol against chlorpyrifos-induced oxidative stress and memory deficits in rats via GSK3 β -Nrf2 signaling pathway. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 2018; 152:29-37.

JANKOVIC, J.; TAN, E.K. Parkinson’s disease: etiopathogenesis and treatment. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry* 2020; 91:795-808.

JIANG, P.; DICKSON, D.W. Parkinson’s disease: experimental models and reality. *Acta Neuropathol* 2018; 135: 13–32.

KAINDLSTORFER, C.; STEFANOVA, N.; GARCIA, J.; KRISMER, F. DÖBRÖSSY, M.; GÖBEL, G.; JELLINGER, K.; GRANATA, R.; WENNING, G. K. L-dopa response pattern in a rat model of mild striatonigral degeneration. *Plos one* 2019; 14(6): e0218130.

KAM, T.I.; HINKLE, J.T.; DAWSON, T.M.; DAWSON, V.L. Microglia and astrocyte dysfunction in parkinson’s disease. *Neurobiol Dis.* 2020; 144:105028.

KAUR, R.; MEHAN, S., SINGH, S. Understanding multifactorial architecture of Parkinson’s disease: pathophysiology to management. *Neurological Sciences*, 2018; 40: 13-23.

KONG, X-P.; ZHANG, B-H; WANG, J. Multiple Roles of Mesoporous Silica in Safe Pesticide Application by Nanotechnology: A Review. *J. Agric. Food Chem.* 2021; 69(24): 6735-6754.

KWON, D.K.; KWATRA, M.; WANG, J.; KO, H.S. Levodopa-Induced Dyskinesia in Parkinson’s Disease: Pathogenesis and Emerging Treatment Strategies. *Cells.* 2022; 11(23):3736

LATT, M.D., LEWIS, S., ZEKRY, O.; FUNG, V.S.C. Factors to Consider in the Selection of Dopamine Agonists for Older Persons with Parkinson’s Disease. *Drugs Aging* 2019; 36:189–202.

LEIKAS, J.V.; KAARIAINEN, M.T.; JALKANEN, J.A.; LEHTONEN, M.; RANTAMAKI, T.; FORSBERG, M.M. Combined Ipsilateral Limb Use Score as an Index of Motor Deficits and Neurorestoration in Parkinsonian Rats. *Journal of Neuroscience Research* 2017; 95: 1858-1870.

LI, X.; WANG, H.; WEN, G.; LI, L.; GAO, Y.; ZHUANG, Z. et al. Neuroprotection by quercetin via mitochondrial function adaptation in traumatic brain injury: PGC-1 α pathway as a potential mechanism. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 2018; 22(2): 883-891.

LIU, C.; LIANG, M.C.; SOONG, T.W. Nitric Oxide, Iron and Neurodegeneration. *Front Neurosci.* 2019; 18(13):114.

LOPES, L.E.S. Efeito neuroprotetor do extrato aquoso de *Tradescantia spathacea* sobre a lesão da via nigroestriatal em ratos. Dissertação (Mestrado em Saúde e Ambiente) - Universidade Tiradentes. Sergipe. p.73. 2019.

LOPES, L.E.S.; BARROSO, S.S.; CALDAS, J.K.M.; VASCONCELOS, P.R.; CANUTO, K.M.; DARIVA, C.; SANTOS, K.S.; SEVERINO, P; CARDOSO, J.C.; SOUTO, E.B.; GOMES, M.Z. Neuroprotective effects of *Tradescantia spathacea* tea bioactives in Parkinson’s disease: In vivo proof-of-concept. *Journal of Traditional and Complementary Medicine*, 2024; xx(xx):xxx (in press).

LÓPEZ-SAUCEDO, F.; FLORES-ROJAS, G.G.; MELÉNDEZ-ORTIZ, H.I.; MORFÍN-GUTIERREZ, A.; LUNA-STRAFFON, M.A.; BUCIO, E. Chapter 14—Stimuli-Responsive Nanomaterials for Drug Delivery. In: MOHAPATRA S.S., RANJAN S., DASGUPTA N., MISHRA R.K., THOMAS S., editors. *Characterization and Biology of Nanomaterials for Drug Delivery*. Elsevier; Amsterdam. The Netherlands: 2019. pp. 375–424.

LOTIA, M.; JANKOVIC, J. New and emerging medical therapies in Parkinson's disease. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 2016; 17(7): 895-909.

LUCIANO-MONTALVO, C.; BOULOGNE, I.; GAVILLÁN-SUÁREZ, J. A screening for antimicrobial activities of Cribbean herbal remedies. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 2013; 13(126): 1-9.

LUNGARE, S.; HALLAM, K.; BADHAN, R.K.S. Phytochemical-loaded mesoporous silica nanoparticles for nose-to-brain olfactory drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics* 2016; 513 (1–2): 280-293,

MAGNO, L.A.V.; COLLODETTI, M.; TENZA-FERRER, H; ROMANO-SILVA, M.A. Cylinder Test to Assess Sensory-motor Function in a Mouse Model of Parkinson's disease. *Bio-protocol* 2019; 9(16): e3337.

MAQSOUDELOU, A.; ASSADPOUR, E.; MOHEBODINI, H.; JAFARI, S.M. The influence of nanodelivery systems on the antioxidant activity of natural bioactive compounds, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2020. 1-25.

MATUSSIN, S.N.; HARUNSANI, M.H.; TAN, A.L.; MOHAMMAD, A.; CHO, M.H.; KHAN, M.M. Photoantioxidant studies of SnO₂ nanoparticles fabricated using aqueous leaf extract of *Tradescantia spathacea*. *Solid State Sciences*, 2020; 105.

MCGREGOR, M.M.; NELSON, A.B. Circuit Mechanisms of Parkinson's Disease. *Neuron* 2019; 101(6): 1042-1056.

MENA-REJON, G.; CAAMAL-FUENTES, E.; CANTILLO-CIAU, Z.; CEDILLO-RIVERA, R.; FLORES-GUIDO, J.; MOO-PUC, R. In vitro cytotoxic activity of nine plants used in Mayan traditional medicine. *Journal of Ethnopharmacology* 2009; 121: 462-465.

MORI, M. A., DELATTRE, A. M., CARABELLI, B., PUDELL, C., BORTOLANZA, M., STAZIAKI, P. et al. Neuroprotective effect of omega-3 polyunsaturated fatty acids in the 6-OHDA model of Parkinson's disease is mediated by a reduction of inducible nitric oxide synthase. *Nutritional Neuroscience* 2017; 21(5), 341–351.

NARAYAN R., NAYAK U.Y., RAICHUR A.M., GARG, S. Mesoporous Silica Nanoparticles: A Comprehensive Review on Synthesis and Recent Advances. *Pharmaceutics*. 2018; 10:118.

NUNES, J.C.; MELO, P.T.S.; LOREVICE, M.V.; AOUADA, F.A.; MOURA, M.R. Effect of green tea extract on gelatin-based films incorporated with lemon essential oil. *J Food Sci Technol*. 2021; 58(1):1-8.

OLIVEIRA, M.R.; DEON, M.; BENVENUTTI, E.V.; BARROS, V.A.; DE MELO, D.C.; FRANCESCHI, E.; EGUES, S.M.; DE CONTO, J.F. Effect of microwave irradiation on the structural, chemical, and hydrophilicity characteristics of ordered mesoporous silica SBA-15. *Journal of Sol-Gel Science and Technology* 2020; 1-15.

OLIVEIRA, M.R.; OLIVEIRA, M.M.; OLIVEIRA, R.J.; DERVANOSKI, A.; FRANCESCHI, E.; EGUES, S.M.; DE CONTO, J.F. Amine-modified silica surface applied as adsorbent in the phenol adsorption assisted by ultrasound. *Chemical Engineering Communications* 2019; 1-16.

PENTTINEN, A-M.; SULEYMANOVA, I.; ALBERT, K.; ANTTILA, J.; VOUTILAINEN, M.H.; AIRAVAARA, M. Characterization of a new low-dose 6-hydroxydopamine model of Parkinson's disease in rat. *Journal of Neuroscience Research*, 2016; 94(4): 318-328.

PIERCE, E.J.; JULIE PÉRON, The basal ganglia and the cerebellum in human emotion. *Social Cognitive and Affective Neuroscience*, 2020; 15(5): 599–613.

RASTEGARI E, HSIAO Y-J, LAI W-Y, LAI Y-H, YANG T-C, CHEN S-J, HUANG P-I, CHIOU S-H, MOU C-Y, CHIEN Y. An Update on Mesoporous Silica Nanoparticle Applications in Nanomedicine. *Pharmaceutics*. 2021; 13(7):1067.

RAZA, C.; ANJUM, R.; SHAKEEL, N.A. Parkinson's disease: Mechanisms, translational models and management strategies. *Life Sciences* 2019; 226, 77-90.

REAL, C.C.; DOORDUIN, J.; FELTES, P.K.; GARCIA, D.V.; FARIA, D.P.; BRITTO, L.R.; et al. Evaluation of exercise-induced modulation of glial activation and dopaminergic damage in a rat model of Parkinson's disease using [11C]PBR28 and [18F]FDOPA PET. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* 2017; 1-16.

REICH, S.G.; SAVITT, J.M. Parkinson's Disease. *Medical Clinics of North America* 2019;103(2):337-350.

RETAMOZO, M.H.; SILVA, C.C.; TAMAYOSE, C.I.; CARVALHO, J.C.S.; ROMOFF, P.; FÁVERO, O.A.; FERREIRA, M.J.P. Chemical Constituents from Leaves of *Baccharis sphenophylla* (Asteraceae) and Their Antioxidant Effects. *Plants* **2023**; 12(6): 1262

RIZK, M.Z.; ABO-EL-MATTY, D.M.; ALY, H.F; ABD-ALLA, H.I.; SALEH, S.M.; YOUNIS, E.A.; ELNAHRAWY, A.M.; HAROUN, A.A.; Therapeutic activity of sour orange albedo extract and abundant flavanones loaded silica nanoparticles against acrylamide-induced hepatotoxicity, *Toxicology Reports* 2018;5, 929-942.

ROSALLES-REYES, T.; DE LA GARZA, M.; ARIAS-CASTRO, C.; RODRÍGUEZ-MENDIOLA, M.; FATTEL-FAZENDA, S.; ARCE-POPOCA, E. et al. Aqueous crude extract of *Rhoeo discolor*, a Mexican medicinal plant, decreases the formation of liver preneoplastic foci in rats. *Journal of Ethnopharmacology* 2008; 115(3): 381-386.

SAMPAIO, T.B.; PINTON, S.; DA ROCHA, J.T.; GAI, B.M.; NOGUEIRA, C.W. Involvement of BDNF/TrkB signaling in the effect of diphenyl diselenide on motor function in Parkinson's disease rat model. *European Journal of Pharmacology* 2017; 795: 28-35.

SÁNCHEZ-ROQUE, Y.; AYORA-TALAVERA, G.; RINCÓN-ROSALES, R.; GUTIÉRREZ-MICELI, F.A.; MEZA-GORDILLO, R.; WINKLER, R. et al. The flavonoid fraction from *Rhoeo discolor* leaves acting as antiviral against influenza A virus. *Records of Natural Products* 2017; 11(6):532-546.

SARAVANAKUMAR, M.; RAJA, B. Veratric acid, a phenolic acid attenuates blood pressure and oxidative stress in l-NAME induced hypertensive rats. *European Journal of Pharmacology*, 2011. 671(1–3): 87-94.

SCHAPIRA, A.H.V.; FOX, S.H.; HAUSER, R.A.; JOSEPH JANKOVIC, J.; JOST, W.H.; KENNEY, C.; KULISEVSKY, J.; PAHWA, R.; POEWE, W.; ANAND, R. Assessment of Safety and Efficacy of Safinamide as a Levodopa Adjunct in Patients With Parkinson Disease and Motor Fluctuations: A Randomized Clinical Trial. *JAMA Neurol.* 2017;74(2):216–224

SHABAB, T.; KHANABDALI, R.; MOGHADAMTOUSI, S.Z.; KADIR, H.A.; MOHAN, G. Neuroinflammation pathways: a general review. *International Journal of Neuroscience* 2017; 127:624-633.

SIMOLA, N.; MORELLI, M.; CARTA, A.R. The 6-hydroxydopamine model of Parkinson's disease. *Neurotoxicity research* 2007; 11(3-4):151-167.

SINGH, S.; KUMAR, P. Piperine in combination with quercetin halt 6-OHDA induced neurodegeneration in experimental rats: Biochemical and neurochemical evidences. *Neuroscience Research* (2018); 133: 38-47.

SRIWANTHANA, B.; TREESANGSRI, W.; BORIBOONTRAKUL, B.; NIUMSAKUL, S.; CHAVALITTUMRONG, P. In vitro effects of Thai medicinal plants on human lymphocyte activity. *Journal of Science Technology* 2007; 29(1): 17-28.

STEPHEN, S.; GORAIN, B.; CHOUDHURY, H.; CHATTERJEE, B. Exploring the role of mesoporous silica nanoparticle in the development of novel drug delivery systems. *Drug Deliv Transl Res.* 2022; 12(1):105-123.

SU, R-J.; ZHEN, J-L.; WANG, W.; ZHANG, J-L.; ZHENG, Y.; WANG, X.M. Time-course behavioral features are correlated with Parkinson's disease-associated pathology in a 6-hydroxydopamine hemiparkinsonian rat model. *Molecular medicine reports* 2018; 17: 3356-3363.

TAN, J.B.L.; LIM, Y.Y.; LEE, S.M. Antioxidant and antibacterial activity of *Rhoeo spathacea* (Swartz) Stearn leaves. *Journal of Food Science and Technology* 2015; 52(4): 2394-2400.

TAN, J.B.L.; LIM, Y.Y.; LEE, S.M. *Rhoeo spathacea* (Swartz) Stearn leaves, a potential natural food colorant. *Journal of Functional foods*, 2014; 7(1): 443-451.

TOLOSA, E.; GARRIDO, A.; SCHOLZ, S.W.; POEWE, W. Challenges in the diagnosis of Parkinson's disease, *The Lancet Neurology*, 2021; 20(5): 385-397.

TRIGO-DAMAS, I.; DEL REY, N.L-G.; BLESÁ, J. Novel models for Parkinson's disease and their impact on future drug discovery. *Expert Opinion on Drug Discovery* 2018; 13(3): 229-239.

TRIST, B.G.; HARE, D.J.; DOUBLE, K.L. Oxidative stress in the aging substantia nigra and the etiology of Parkinson's disease. *Aging Cell.* 2019; 18:e13031

TU, L.; WU, Z.Y.; YANG, X.L.; ZHANG, Q.; GU, R.; WANG, Q.; TIAN, T.; YAO, H.; QU, X.; TIAN, J.Y. Neuroprotective effect and mechanism of baicalin on Parkinson's disease model induced by 6-OHDA. *Neuropsychiatr Dis Treat.* 2019; 31(15):3615-3625.

UDUWANA, S.; ABEYNAYAKE, N.; WICKRAMASINGHE, I. Synergistic, antagonistic, and additive effects on the resultant antioxidant activity in infusions of green tea with bee honey and *Citrus limonum* extract as additives. *Journal of Agriculture and Food Research* 2023; 12: 100571.

ULLAH A, MUNIR S, BADSHAH SL, KHAN N, GHANI L, POULSON BG, EMWAS A-H, JAREMKO M. Important Flavonoids and Their Role as a Therapeutic Agent. *Molecules.* 2020; 25(22): 5243.

WALSH, R.N.; CUMMINS, R.A. The open-field test: A critical review. *Psychological Bulletin* 1976. 83(3): 482-504.

YU, Q.; CHEN, S; TANG, H.; ZHANG, X.; TAO, R.; YAN, Z.; SHI, J.; GUO, W.; ZHANG, S. Veratric acid alleviates liver ischemia/reperfusion injury by activating the Nrf2 signaling pathway. *International Immunopharmacology*, 2021; 101 (Part B): 108294.

YUAN, X.; YANG, Y.; XIA, D.; MENG, L.; HE, M.; LIU, C.; ZHANG, Z. SILICA NANOPARTICLES Promote α -Synuclein Aggregation and Parkinson's Disease Pathology. *Front Neurosci.* 2022; 13(15): 807988

ZAITONE, S.A.; AHMED, E.; ELSHERBINY, N.M.; MEHANNA, E.T.; EL-KHERBETAWY, M.K.; ELSAYED, M.H.; ALSHAREEF, D.M.; MOUSTAFA, Y.M. Caffeic acid improves locomotor activity and lessens inflammatory burden in a mouse model of rotenone-induced nigral neurodegeneration: Relevance to Parkinson's disease therapy. *Pharmacol Rep.* 2019 Feb;71(1):32-41

ZAITONE, S.A.; AHMED, E.; ELSHERBINY, N.M.; MEHANNA, E.T.; EL-KHERBETAWY, M.K.; ELSAYED, M.H.; ALSHAREEF, D.M.; MOUSTAFA, Y.M.; Caffeic acid improves locomotor activity and lessens inflammatory burden in a mouse model of rotenone-induced nigral neurodegeneration: Relevance to Parkinson's disease therapy, *Pharmacological Reports* 2019; 71, 32–41.

ZHANG, Y.; WU, Q.; ZHANG, L.; WANG, Q.; YANG, Z.; LIU, J.; FENG, L. Caffeic acid reduces A53T α -synuclein by activating JNK/Bcl-2-mediated autophagy in vitro and improves behaviour and protects dopaminergic neurons in a mouse model of Parkinson's disease. *Pharmacological Research* 2019; 150:104538.

ZIMCIKOVA, E.; SIMKO, J.; KARESOVA, I.; KREMLACEK, J.; MALAKOVA, J. Behavioral effects of antiepileptic drugs in rats: Are the effects on mood and behavior detectable in open field test? *Seizure - European Journal of Epilepsy*, 2017; 52: 35-40.

ANEXO 1 – EXSICATA DA *Tradescantia spathacea*

ANEXO 2 – CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DA CEUA



UNIVERSIDADE TIRADENTES
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO, PESQUISA E EXTENSÃO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO ANIMAL - CEUA

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DA CEUA

Certificamos que a proposta intitulada “Avaliação do efeito neuroprotetor de nanopartículas poliméricas com *Tradescantia spathacea*, associadas ou não à L-DOPA, em modelo pré-clínico para estudo da doença de Parkinson”, registrada com o nº 020919, sob a responsabilidade de Margarete Zanardo Gomes, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi Aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE TIRADENTES, em reunião de 09/10/2019.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa
Vigência da autorização	01/12/2019 a 31/12/2021
Espécie linhagem raça	<i>Rattus norvegicus</i> / Wistar
Nº de Animais	70 ratos
Peso idade	Peso: 180 a 250g / Idade: 2 a 3 meses
Sexo	Machos
Origem	Biotério da Universidade Tiradentes

Aracaju, 09 de outubro de 2019

UNIVERSIDADE TIRADENTES - UNIT
Prof.^a Maria Júlia Nardelli
Comitê de Ética no Uso Animal
Coordenadora

Maria Júlia Nardelli
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso Animal – CEUA
Universidade Tiradentes - UNIT

UNIVERSIDADE TIRADENTES
AV. MURILO DANTAS Nº 300 B FAROLÂNDIA
CEP: 49.032-490 - ARACAJU - SE - BRASIL

TELEFONE: (79) 3218.2206
FAX: (79) 3218.2100

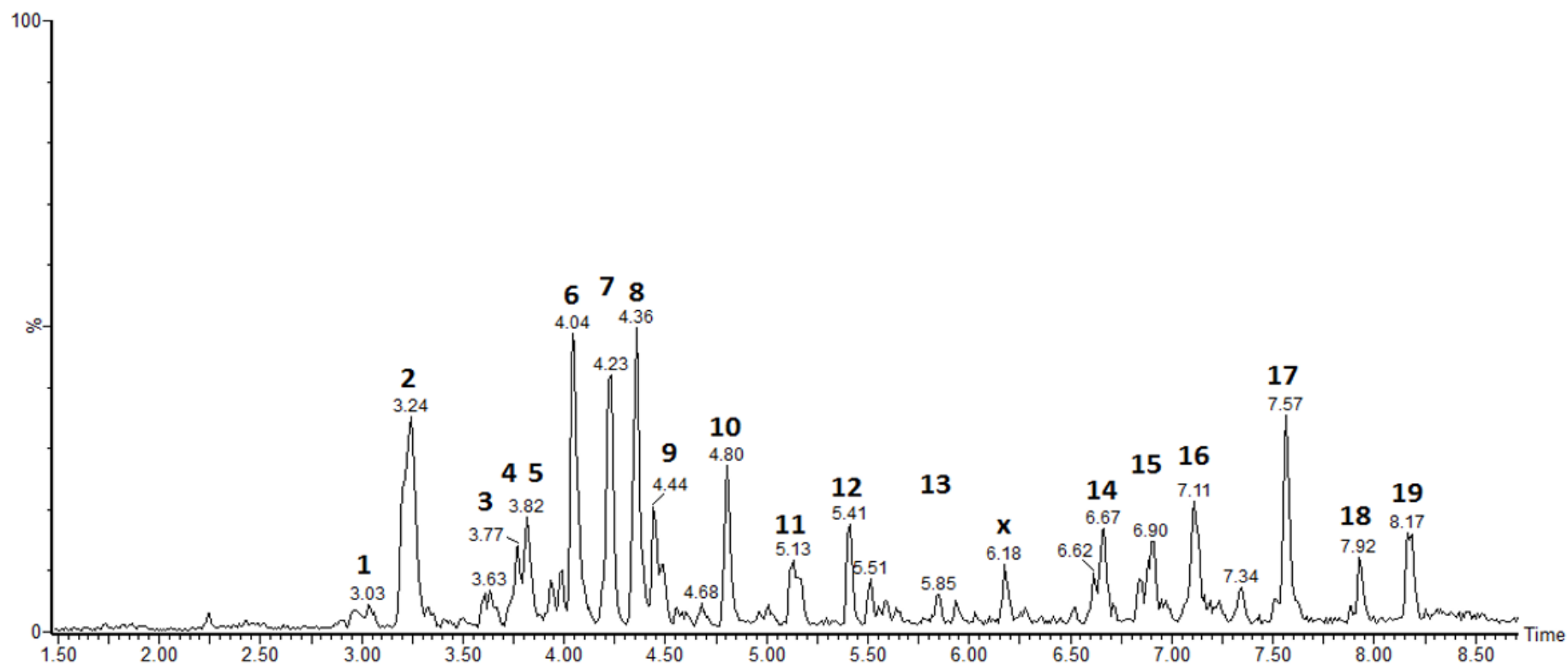
ANEXO 3 – IDENTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS DO EATS

Tabela - Identificação de biocompostos do extrato aquoso de *Tradescantia spathacea*.

n	Rt min	[M-H] ⁻ Observada	[M-H] ⁻ Calculada	Product Ions (MS/MS)	Fórmula empírica	Ppm (erro)	Composto	Referência
1	2.98	181.0495	181.0501	161.0390, 135.0489	C ₉ H ₉ O ₄	-3.3	Ácido Veratríco ¹	Jia <i>et al.</i> , 2020
2	3.24	207.0295	207.0295	179.0376, 163.0399	C ₁₀ H ₇ O ₅	1.0	Fraxetina	Saleem <i>et al.</i> , 2019
3	3.63	593.1505	593.1506	473.1264, 353.0658	C ₂₇ H ₂₉ O ₁₅	-0.2	Vicenín 2 ¹	Farooq <i>et al.</i> , 2020
4	3.77	311.0769	311.0767	193.0460, 178.0218, 149.0456, 134.0351	C ₁₄ H ₁₅ O ₈	0.6	Ácido ferulíco treônico ¹	Wang <i>et al.</i> , 2017
5	3.82	179.0345	179.0344	135.0477	C ₉ H ₇ O ₄	0.6	Ácido cafeíco ^{1*}	Campos <i>et al.</i> , 2020
6	4.04	351.1291	351.1291	249.0609	C ₁₄ H ₂₃ O ₁₀	0.0	Desconhecido	-
7	4.23	371.0977	371.0978	249.0576, 121.0303, 113.0255	C ₁₆ H ₁₉ O ₁₀	-0.3	Desacetilasperulosídeo ¹	Ouchemoukh <i>et al.</i> , 2014
8	4.35	163.0391	163.0395	119.0493	C ₉ H ₇ O ₃	-2.5	Ácido <i>p</i> -cumaríco ^{*1}	Amaya-Cruz <i>et al.</i> , 2018
9	4.44	385.1144	385.1135	207.1059, 113.0237	C ₁₇ H ₂₁ O ₁₀	2.3	Ácido sinápico-O-hexosídeo ¹	Lorenzo <i>et al.</i> , 2018
10	4.80	693.2028	693.2031	271.0932	C ₃₂ H ₃₇ O ₁₇	-0.4	Heloniosídeo A	Zou <i>et al.</i> , 2017
11	5.13	691.2618	691.2602	335.1241	C ₃₄ H ₄₃ O ₁₅	2.3	Desconhecido	-
12	5.41	271.0964	271.0970	-	C ₁₆ H ₁₅ O ₄	-2.2	Vestitol	Yerlikaya <i>et al.</i> , 2019
13	5.84	675.2654	675.2653	-	C ₃₄ H ₄₃ O ₁₄	0.1	Desconhecido	-
14	6.67	375.2758	375.2747	-	C ₂₀ H ₃₉ O ₆	-2.4	Derivado de ácido graxo ¹	-
15	6.90	373.2583	373.2590	-	C ₂₀ H ₃₇ O ₆	-1.9	Derivado de ácido graxo ¹	-
16	7.11	327.2161	327.2171	229.1406, 211.1334	C ₁₈ H ₃₁ O ₅	-3.1	Isômero do ácido pinelíco ¹	Barragán-Zaratea <i>et al.</i> , 2020
17	7.34	371.2420	371.2434	-	C ₂₀ H ₃₅ O ₆	-3.8	Derivado de ácido graxo ¹	-
18	7.56	329.2317	329.2328	229.1441, 211.1323	C ₁₈ H ₃₃ O ₅	-3.3	Isômero do ácido pinelíco ¹	Barragán-Zaratea <i>et al.</i> , 2020
19	7.94	359.2785	359.2797	-	C ₂₀ H ₃₉ O ₅	-3.3	Derivado de ácido graxo ¹	-

* indica comparação com o padrão. ¹ indica fragmentos de dados do MS/MS. Fonte: Lopes (2024).

Cromatograma UPLC-QTOF-MS, modo negativo, extrato aquoso da *Tradescantia spathacea*



Fonte: Lopes, 2024.