

## EFEITO DE NANOPARTÍCULAS CONTENDO ALFA-HUMULENO E CURCUMINA SOBRE AS CITOCINAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS

 <https://doi.org/10.56238/arev7n2-235>

**Data de submissão:** 20/01/2025

**Data de publicação:** 20/02/2025

**João Alfredo Schiewe**

Acadêmico de Medicina

Instituição: Universidade Estadual do Centro-Oeste (UNICENTRO)

E-mail: jalfredoschiewe@gmail.com

**Isabella Cristina Chiamolera**

Acadêmica de Medicina

Instituição: Universidade Estadual do Centro-Oeste (UNICENTRO)

E-mail: bela.chiamolera@gmail.com

**Giovanna Tardem Oliveira**

Acadêmica de Medicina

Instituição: Universidade Estadual do Centro-Oeste (UNICENTRO)

E-mail: giovanna.tardem@gmail.com

**Livia Hoyer Garcia Miranda**

Acadêmica de Medicina

Instituição: Universidade Estadual do Centro-Oeste (UNICENTRO)

E-mail: livia.hoyer@hotmail.com

**Jaine Alessandra Korchak Alves**

Graduada em Fisioterapia

Instituição: Universidade Estadual do Centro-Oeste (UNICENTRO)

E-mail: korchakjaine@gmail.com

**Daniele Eurick**

Graduada em Fisioterapia

Instituição: Universidade Estadual do Centro-Oeste (UNICENTRO)

E-mail: eurickdaniele@gmail.com

**Luciano Pavan Rossi**

Doutor em Fisiologia da Performance

E-mail: lucianofisioo@yahoo.com.br

**Ivo Ilvan Kerppers**

Ph.D em Engenharia Biomédica

Instituição: Universidade Estadual do Centro-Oeste (UNICENTRO)

E-mail: ikerppers@unicentro.br

### RESUMO

O estudo investigou os efeitos neuroprotetores de nanopartículas contendo curcumina e alfa-humuleno na neuroinflamação induzida pela toxina Beta Amiloide1-42 ( $A\beta 1-42$ ), com o objetivo de avaliar a

modulação de citocinas inflamatórias em um modelo experimental de doença de Alzheimer (DA). A neuroinflamação é um fator-chave na progressão da DA, e os compostos estudados mostraram potencial para mitigar os efeitos prejudiciais desse processo. Foram utilizados 63 ratos Wistar, divididos em seis grupos, tratados com curcumina, alfa-humuleno ou suas respectivas formulações em nanopartículas. As nanopartículas foram desenvolvidas para otimizar a biodisponibilidade e a eficácia terapêutica, visando atravessar a barreira hematoencefálica. As análises de citometria de fluxo focaram nas citocinas pró-inflamatórias TNF- $\alpha$  e IL-1 e na anti-inflamatória IL-4. Os resultados demonstraram que o tratamento com nanopartículas de curcumina e alfa-humuleno reduziu significativamente os níveis de TNF- $\alpha$  e aumentou os de IL-4, sugerindo uma resposta neuroinflamatória mais favorável. No entanto, não houve variação estatisticamente significativa nos níveis de IL-1 entre os grupos tratados. Os achados sugerem que essas nanopartículas possuem um efeito neuroprotetor promissor, oferecendo uma alternativa terapêutica potencial para a DA.

**Palavras-chave:** Ativação Microglial. Neurofibrilação. Doença de Alzheimer.

## 1 INTRODUÇÃO

A neuroinflamação é uma resposta que ocorre no Sistema Nervoso Central (SNC), envolvendo principalmente o cérebro e a medula espinhal, sendo iniciado por vários estímulos, incluindo infecções, lesões traumáticas, substâncias tóxicas e reações autoimunes (LENG; EDISON, 2021). Os principais mediadores da neuroinflamação são as células imunológicas do SNC, particularmente a micróglia e os astrócitos, que são ativados em resposta a esses insultos. Essa ativação leva à produção de mediadores inflamatórios, como citocinas, quimiocinas e espécies reativas de oxigênio, que desempenham papéis críticos na modulação da resposta inflamatória (WANG et al., 2023). Embora a neuroinflamação sirva como um mecanismo de proteção contra danos adicionais, sua desregulação pode resultar em inflamação crônica, sendo caracterizada pela ativação sustentada das células gliais, pela liberação prolongada de mediadores inflamatórios e pela possível quebra da barreira hematoencefálica (BHE) (THAKUR et al., 2023). Esse estado inflamatório é reconhecido como um fator contribuidor na patogênese de várias doenças neurodegenerativas – como a Doença de Alzheimer (DA) – provavelmente devido a deposição de peptídeos beta amiloide, conforme explicado pela hipótese amiloide (BREIYEH; KARAMAN, 2020; VAISERMAN; KOLIADA; LUSHCHAK, 2020). Assim, a compreensão da neuroinflamação, com efeitos protetores e prejudiciais, requer uma abordagem que leve em consideração o contexto, a duração e a intensidade da resposta inflamatória (LENG; EDISON, 2021; WANG et al., 2023).

Ademais, a interação entre citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias é fundamental para a neuroinflamação, desempenhando papéis cruciais em sua regulação, influenciando tanto a iniciação quanto a resolução das respostas inflamatórias (BECHER; SPATH; GOVERMAN, 2017). O TNF- $\alpha$  é uma citocina pró-inflamatória chave, atuando como mediador da neuroinflamação, facilitando o recrutamento de células imunológicas para os locais de lesão. Níveis elevados de TNF- $\alpha$  têm sido associados à DA, contribuindo para o dano neuronal e a progressão da doença por meio de mecanismos como disfunção sináptica e apoptose (BORASCHI et al., 2023; WANG et al., 2015). A IL-1 é outra citocina pró-inflamatória crítica, e desempenha um papel duplo na neuroinflamação, atuando tanto como mediadora da inflamação quanto como fator neuroprotetor em certas condições. No entanto, a superprodução crônica de IL-1 pode perpetuar ciclos inflamatórios e promover ambientes neurotóxicos (BECHER; SPATH; GOVERMAN, 2017; KONSMAN, 2022). Já a IL-4 é uma citocina que desempenha um papel protetor contra a neuroinflamação. Ela é produzida principalmente pelas células T auxiliares do tipo 2 e é conhecida por promover a diferenciação da micróglia em um fenótipo anti-inflamatório. A IL-4 exerce seus efeitos ao inibir a produção de citocinas pró-inflamatórias e aumentar a expressão de fatores neuroprotetores. Essa mudança no

ambiente de citocinas pode ajudar a resolver a inflamação e promover a reparação tecidual após lesões no SNC (DISABATO; QUAN; GODBOUT, 2016; GALEA; GRAEBER, 2023). Assim, níveis elevados de TNF- $\alpha$  e IL-1 podem indicar neuroinflamação ativa e podem servir como biomarcadores de progressão da doença ou resposta à terapia, enquanto níveis aumentados de IL-4 podem refletir uma tentativa de combater os processos inflamatórios e promover a recuperação (BORASCHI et al., 2023; DISABATO; QUAN; GODBOUT, 2016; WANG et al., 2015).

Nesse sentido, o uso da terapia à base de plantas medicinais constitui uma abordagem atrativa para o tratamento de vários distúrbios inflamatórios e, dadas as limitações dos tratamentos atuais para a DA, há um crescente interesse em seu potencial terapêutico e compostos bioativos, especialmente a curcumina e o alfa-humuleno, que podem mitigar a neuroinflamação e suas consequências na DA, por meio da modulação da resposta imunológica e redução de citocinas pró-inflamatórias (BORDOLOI et al., 2024; WENDLER et al., 2024). A Curcumina tem atraído atenção por seus efeitos neuroprotetores. Ela possui potentes propriedades anti-inflamatórias, antioxidantes e antiamiloidogênicas, tornando-se promissora para o tratamento da DA. Estudos demonstraram que a curcumina pode inibir a agregação dos peptídeos A $\beta$ , reduzindo a formação de placas e a neuroinflamação associada. Além disso, a curcumina demonstrou modular vias de sinalização importantes, incluindo a ativação do fator neurotrófico derivado do cérebro, crucial para a sobrevivência neuronal e a função cognitiva (BORDOLOI et al., 2024; OLIVEIRA; PIENIZ, 2024). O alfa-humuleno, um sesquiterpeno encontrado no lúpulo, também tem se mostrado promissor no contexto da neuroinflamação e DA. Estudos destacaram seus efeitos anti-inflamatórios, particularmente em modelos de neuroinflamação induzida por A $\beta$  (WENDLER et al., 2024). O perfil de segurança e baixa incidência de efeitos colaterais destes compostos aumentam sua atratividade como uma estratégia terapêutica complementar (BORDOLOI et al., 2024; NAGORI et al., 2023).

Ainda, para que uma terapia voltada à DA seja eficaz, os medicamentos devem ser capazes de atravessar a BHE. Esta, atua como uma primeira linha de defesa, impedindo a entrada de compostos indesejados no cérebro (WU et al., 2023). Nesse contexto, os nanotransportadores surgem como uma solução promissora, ao protegerem os medicamentos da degradação e preservarem sua eficácia terapêutica. Esses nanocarreadores têm a capacidade de reconhecer e se ligar a alvos específicos, proporcionando uma ação precisa nas células-alvo (AHLAWAT et al., 2020; ALOTAIBI et al., 2021). A nanomedicina também permite aumentar os níveis intracelulares do medicamento encapsulando-o em nanocarreadores diversos, como as nanopartículas poliméricas (NPs) (AHLAWAT et al., 2020; PINHEIRO et al., 2021). As NPs podem ser estruturadas como nanocápsulas ou nanoesferas. As nanocápsulas têm uma estrutura vesicular, na qual o fármaco é dissolvido em um núcleo líquido

envolto por uma cápsula polimérica. Já as nanoesferas consistem em uma matriz polimérica onde o fármaco é disperso nas lacunas ou adsorvido na superfície da esfera. Ambos os tipos possuem vantagens como liberação controlada de fármacos e possibilidade de modificações na superfície para direcionamento ao cérebro, além de serem seguros, biodegradáveis e facilmente eliminados pelo organismo. Essas características têm incentivado a pesquisa sobre seu uso no diagnóstico e tratamento de diversas doenças neurodegenerativas (ABOZAID et al., 2022; AHLAWAT et al., 2020; ALOTAIBI et al., 2021; PINHEIRO et al., 2021; SASTRI et al., 2022; WANG et al., 2022; WENDLER et al., 2024).

Deste modo, o objetivo deste estudo foi de avaliar os efeitos neuroprotetores de nanopartículas contendo alfa-humuleno e curcumina em um modelo experimental de DA. Especificamente, buscou-se analisar quantitativamente as citocinas pró-inflamatórias (TNF- $\alpha$  e IL-1) e anti-inflamatórias (IL-4) após a indução de neuroinflamação pela Toxina Beta Amiloide 1-42 (A $\beta$ 1-42).

## 2 METODOLOGIA

### 2.1 CÁLCULO AMOSTRAL

O cálculo amostral foi realizado com base no teorema do limite central, que sustenta que a média de uma amostra aleatória de uma grande população tende a se aproximar da média da população total. Considerando-se uma população de 2.000 indivíduos com Doença de Alzheimer no município de Guarapuava, uma margem de erro de 10%, um nível de confiança de 95% e uma homogeneidade de 99%, o tamanho amostral calculado foi de 63 animais. A fórmula utilizada foi:  $n = p(1-p)Z^2/e^2$ , onde “n” representa o tamanho da amostra, “p” é a proporção esperada, “Z” é o valor associado ao nível de confiança, e “e” é a margem de erro.

### 2.2 AMOSTRA

A amostra foi composta por 63 ratos da espécie *Rattus norvegicus*, linhagem Wistar, pesando entre 300 e 350 gramas, provenientes do Biotério da Universidade Estadual de Maringá (UEM), com aprovação do comitê de ética (protocolo número 009/2021). Os animais foram alojados em gaiolas de acrílico, cada uma contendo no máximo quatro animais, mantidas em prateleiras sob um ciclo de 12 horas de luz (das 7h às 19h), com temperatura controlada a  $23 \pm 1$  °C.

## 2.3 GRUPOS EXPERIMENTAIS

Os animais foram divididos em seis grupos:

- Grupo Controle Negativo (CN): 13 animais tratados apenas com água, no mesmo volume dos tratamentos, com coleta de material e eutanásia junto aos demais grupos;
- Grupo Controle Positivo (CP): 10 animais tratados com 5 mg de Cloridrato de Donepezila, 30 dias após indução de neuroinflamação por Beta Amiloide1-42, por gavagem, durante 30 dias consecutivos, com coleta de material e eutanásia no 120º dia;
- Grupo Tratado com  $\alpha$ -Humuleno (HUM): 10 animais tratados com 6,5  $\mu$ g de  $\alpha$ -Humuleno, 30 dias após a indução de neuroinflamação por Beta Amiloide1-42, por gavagem, durante 30 dias consecutivos, com coleta de material e eutanásia no 120º dia;
- Grupo Tratado com Nanopartículas de  $\alpha$ -Humuleno (NHUM): 10 animais tratados de forma similar ao grupo anterior, utilizando  $\alpha$ -Humuleno encapsulado em nanopartículas;
- Grupo Tratado com Curcumina (GCur): 10 animais tratados com 6,5  $\mu$ g de Curcumina, também 30 dias após indução de neuroinflamação, por gavagem, durante 30 dias consecutivos, com eutanásia no 120º dia;
- Grupo Tratado com Nanopartículas de  $\alpha$ -Humuleno e Curcumina (NHUM+Cur): 10 animais tratados com nanopartículas contendo 6,5  $\mu$ g de Curcumina e 6,5  $\mu$ g de  $\alpha$ -Humuleno, por 30 dias consecutivos, com eutanásia no 120º dia.

## 2.4 PREPARAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS

As nanopartículas foram desenvolvidas no laboratório de nanotecnologia da Universidade Estadual do Centro-Oeste (UNICENTRO) pelo método de precipitação anti-solvante, seguindo metodologia adaptada de estudos anteriores (ANTÔNIO et al., 2017; LIU et al., 2017; SUN; DAI; GAO, 2017). A técnica envolve a coacervação entre nanopartículas de Zeína e Quitosana, com ambas as substâncias atuando como estabilizadores. As soluções de Zeína e Quitosana foram preparadas, misturadas em diferentes proporções e submetidas a agitação controlada e processos de centrifugação, garantindo a formação de nanopartículas de tamanho adequado.

## 2.5 DIÂMETRO MÉDIO E ÍNDICE DE POLIDISPERSÃO

O diâmetro médio e o índice de polidispersão (PDI) das nanopartículas serão medidos por meio da técnica de espalhamento dinâmico de luz (DLS) utilizando o equipamento BIC 90 Plus (Brookhaven Instruments Corp., Holtsville, NY). Para as análises, serão coletadas alíquotas das suspensões de nanopartículas antes e após a incubação com quitosana, permitindo a comparação dos

tamanhos e PDI. As nanopartículas serão dispersas em água ultrapura (1:200 v/v) e colocadas em uma cubeta para a análise. Todas as medições serão realizadas com um ângulo de espalhamento de 90° a 25°C e com um comprimento de onda do laser de 659 nm.

## 2.6 POTENCIAL ZETA

O potencial zeta será determinado a partir da mobilidade eletroforética das nanopartículas em suspensão. As amostras serão diluídas (1:200 v/v) em uma solução de KCl 1mM e inseridas em uma célula eletroforética a 25°C, sob um potencial de ±150 mV (ZetaSizer ZS, Malvern, UK). O potencial zeta será analisado tanto antes quanto após a incubação das nanopartículas com quitosana. As medições serão realizadas em triplicata e expressas como média ± desvio padrão.

## 2.7 DETERMINAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAMENTO

A eficiência de encapsulamento (EE) do α-Humuleno nas nanopartículas será determinada de forma indireta. Uma alíquota do sobrenadante resultante da ultracentrifugação das nanopartículas será diluída na fase móvel, filtrada em uma membrana de 0,22 µm e analisada por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) no equipamento Waters 2695-Alliance (Milford, EUA). A fase móvel será composta por metanol, tampão fosfato (pH 6,8) e acetonitrila (63:30:7 v/v/v) com uma vazão de 0,9 mL/min, e o detector de arranjo de diodos (PDA) será ajustado para 306 nm. A porcentagem de EE será calculada a partir de pelo menos três repetições, utilizando a Equação 1. Os resultados serão expressos como média ± desvio padrão.

Equação 1 %EE = [(quantidade inicial de α-Humuleno – quantidade recuperada) / quantidade inicial de α-Humuleno] × 100

## 2.8 PERÍODO PRÉ INDUÇÃO

Durante 30 dias consecutivos, os animais foram tratados conforme os grupos experimentais. Após esse período, foi realizada a indução de neuroinflamação via estereotaxia, utilizando a toxina Aβ1-42 para a formação de placas senis. Os animais permaneceram em observação por 90 dias antes de serem submetidos à eutanásia.

## 2.9 PROCEDIMENTO CIRÚRGICO

Para indução da DA com Toxina Aβ1-42, os animais foram anestesiados com uma solução na proporção de 80mg/kg de cloridrato de cetamina (ketamina, frasco 10ml) para 15 mg/kg de cloridrato de xilazina (dopaser, frasco de 10ml) via intraperitoneal, logo após levados para um aparelho

estereotáxico (David Kopf, EUA) onde suas cabeças foram fixadas pelo rochedo temporal e incisivos superiores, sob coordenadas específicas para a área do hipocampo ( $AP=-3,0\text{mm}$ ,  $ML=1,6\text{mm}$ ,  $1,6\text{mm}$  e  $DV= 3,0\text{mm}$ ), tomando o bregma como referência, recebendo  $4\mu\text{l}$  de Toxina  $A\beta1-42$  através de seringa de Hamilton na região hipocampica de CA1 para o processo de placas senis (MIRI et al., 2018). Após a indução do processo da neuroinflamação, os animais ficaram em descanso por um período de 30 dias para que ocorressem os processos inflamatórios dos neurônios hipocampais. Foi realizada eutanásia de um animal por grupo para verificação da presença de placas no hipocampo.

## 2.10 ANALGESIA PÓS CIRÚRGICA

Foi administrado Cloridrato de Tramadol na dose de  $10\text{ mg/kg}$ , via oral, a cada 12 horas, por sete dias consecutivos, para controle da dor pós-operatória.

## 2.11 TRATAMENTO

Os animais receberam  $6,5\text{ }\mu\text{g}$  de  $\alpha$ -Humuleno, Curcumina ou suas nanopartículas por via oral (gavagem) durante 30 dias consecutivos.

## 2.12 CITOMETRIA DE FLUXO

Dois mL de sangue foram coletados de cada animal e posteriormente centrifugado a  $1500\text{ rpm}$  por 10 min em temperatura ambiente. Após a centrifugação o sobrenadante (soro) foi pipetado e separado para análise. O kit utilizado foi o BD™ Cytometric Bead Array Mouse Inflammation Cytokine Kit (Becton Dickinson, USA). As citocinas analisadas foram TNF- $\alpha$ ; IL-1 e IL-4. De acordo com as instruções do fabricante e analisadas no Citômetro de Fluxo BD™ Accuri C6 (Becton Dickinson, EUA), foram adicionados em cada amostra  $10\mu\text{L}$  de cada reagente. Após este procedimento, foi colocado em um eppendorf de  $1,5\text{ mL}$ , para cada amostra,  $50\mu\text{L}$  dos beads das citocinas,  $50\mu\text{L}$  da amostra (soro) e  $50\mu\text{L}$  de reagente de detecção. Os tubos foram colocados no escuro por duas horas em temperatura ambiente. Após as duas horas, foi adicionado  $1\text{ mL}$  do tampão de lavagem em cada eppendorf e centrifugados a  $200\text{g}$ , em temperatura ambiente, por 5 minutos. Após a centrifugação o sobrenadante foi cuidadosamente removido e descartado de cada amostra, e em seguida foram adicionados  $300\text{ }\mu\text{L}$  do tampão de lavagem em cada tubo para ressuspender as amostras. A leitura no citômetro foi realizada manualmente por meio da aquisição de 10.000 eventos de cada amostra. Os dados da citometria de fluxo foram analisados no software FCAP 3.0 Array (Becton Dickinson, EUA) e os resultados foram plotados em gráficos de médias e desvios-padrão.

## 2.13 EUTANÁSIA

Os animais foram anestesiados com 80 mg/kg de Ketamina e 15 mg/kg de Xilazina. Após verificado o estado anestésico, os mesmos receberam 175 mg/kg de dose letal de Pentobarbital por via intraperitoneal.

## 2.14 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram analisados no software Prisma 9.3.1. O teste de Shapiro-Wilk foi utilizado para verificar a normalidade dos dados, e o teste ANOVA One-Way com pós-teste de Tukey's foi aplicado para amostras não paramétricas.

## 3 RESULTADOS

As nanopartículas de Zeína apresentaram diferentes características de acordo com o composto encapsulado, conforme demonstrado na Tabela 1. Para as nanopartículas contendo apenas curcumina, o diâmetro médio foi de 243,9 nm, com um índice de polidispersão (PDI) de 0,347 e um potencial zeta de -32,7 mV. A eficiência de encapsulamento (EE) foi de 95%, com uma concentração de 617,5 µg/mL de curcumina. As nanopartículas contendo α-humuleno apresentaram um diâmetro médio de 313,1 nm, PDI de 0,221 e potencial zeta de -36,2 mV. A eficiência de encapsulamento dessas nanopartículas foi de 91%, com uma concentração de 591,5 µg/mL de α-humuleno. Por fim, as nanopartículas contendo tanto curcumina quanto α-humuleno apresentaram o maior diâmetro médio, de 351,1 nm, e um PDI de 0,482. O potencial zeta dessas nanopartículas foi consideravelmente menor, de -40 mV. As eficiências de encapsulamento foram mantidas em 95% para a curcumina (617,5 µg/mL) e 91% para o α-humuleno (591,5 µg/mL).

Tabela 1 – Características Físico-Químicas e Eficiência de Encapsulamento das Nanopartículas

Estrutura/Qualificação	Diâmetro médio (nm)	Índice de polidispersão	Potencial Zeta (mV)	Eficiência de encapsulação
Nanopartícula de zeína contendo curcumina	243,9	0,347	-32,7	95% (617,5 µg/ml)
Nanopartícula de zéína contendo alfa-humuleno	313,1	0,221	-36,2	91% (591,5 µg/ml)
Nanopartícula de zeína contendo curcumina e alfa-humuleno	351,1	0,482	-40	95% Curcumina e 91% Alfa-humuleno (617,5 µg/ml de Curcumina e 591,5 µg/ml de alfa-humuleno)

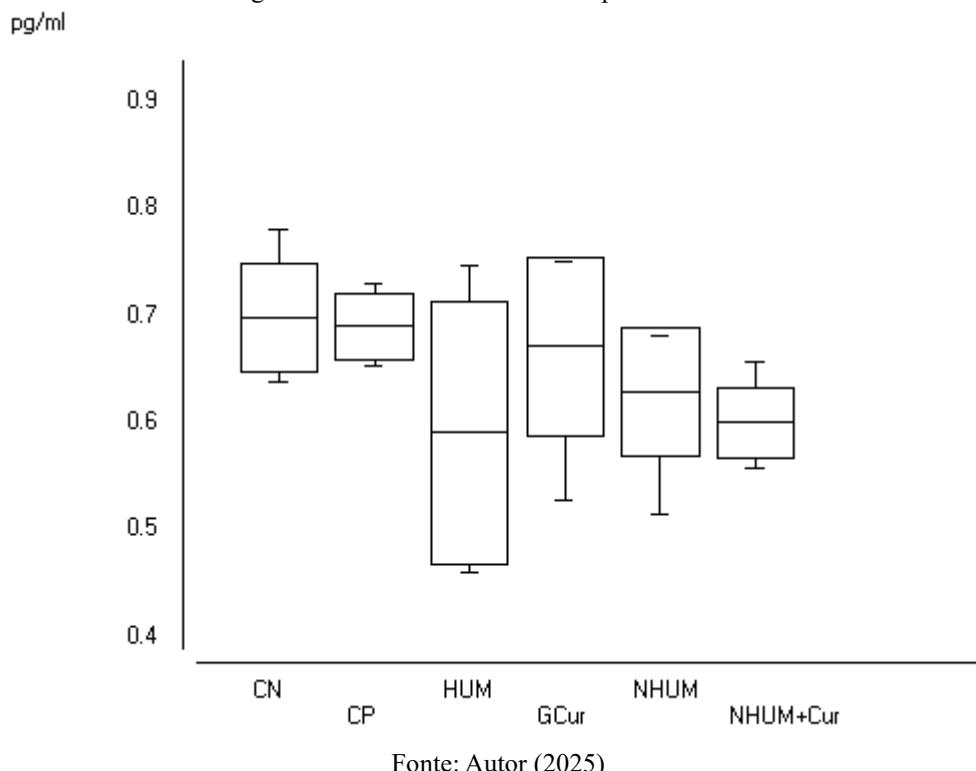
Fonte: Autor (2025)

Os dados obtidos a partir da análise de citocinas pró-inflamatórias (TNF- $\alpha$  e IL-1) e anti-inflamatórias (IL-4) foram apresentados nas Figuras 1, 2 e 3, destacando as médias e desvios padrão dos diferentes grupos experimentais.

### 3.1 TNF- $\alpha$

O Grupo Controle Negativo (CN) apresentou média de  $0,6983 \pm 0,05025$  pg/ml, enquanto o Grupo Controle Positivo (CP) registrou média de  $0,6900 \pm 0,03090$  pg/ml. O grupo tratado com Curcumina (GCur) apresentou uma redução, com média de  $0,5905 \pm 0,12213$  pg/ml, em comparação aos grupos controle. O tratamento com  $\alpha$ -Humuleno (HUM) resultou em uma média de  $0,6713 \pm 0,08390$  pg/ml, enquanto o grupo tratado com nanopartículas de  $\alpha$ -Humuleno (NHUM) apresentou média de  $0,6293 \pm 0,06013$  pg/ml. O grupo tratado com nanopartículas de  $\alpha$ -Humuleno e Curcumina (NHUM+Cur) apresentou média de  $0,6000 \pm 0,03283$  pg/ml. Diferenças estatisticamente significativas foram observadas entre os grupos CN/NHUM+Cur, CP/NHUM+Cur e GCur/NHUM+Cur ( $p<0,05$ ), indicando que o tratamento com as nanopartículas combinadas foi mais eficaz em reduzir os níveis de TNF- $\alpha$ .

Figura 1 – Média e Desvio Padrão para TNF-Alfa.



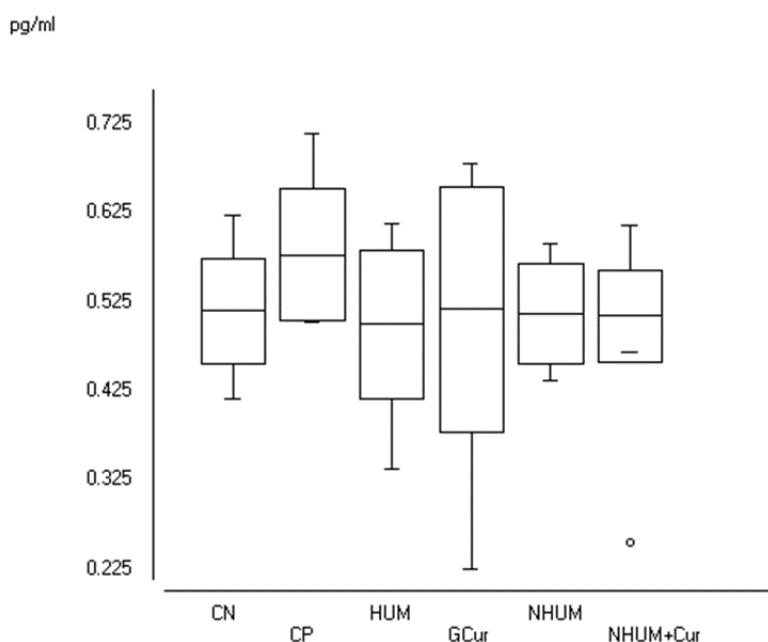
Fonte: Autor (2025)

Foi observada diferença estatisticamente significativa entre os grupos CN/NHUM+Cur, CP/NHUM+Cur e GCur/NHUM+Cur para  $p<0,05$ .

### 3.2 IL-1

Os níveis de IL-1 nos grupos experimentais variaram de forma menos expressiva. O Grupo Controle Negativo (CN) teve uma média de  $0,5150 \pm 0,05782$  pg/ml, enquanto o Grupo Controle Positivo (CP) apresentou média de  $0,5788 \pm 0,07736$  pg/ml. O grupo tratado com Curcumina (GCur) apresentou média de  $0,5000 \pm 0,08211$  pg/ml, seguido pelos grupos HUM ( $0,5187 \pm 0,13611$  pg/ml), NHUM ( $0,5125 \pm 0,05600$  pg/ml) e NHUM+Cur ( $0,4775 \pm 0,09968$  pg/ml). Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos após o teste de Dunn.

Figura 2 – Média e Desvio Padrão para IL-1.



Fonte: Autor (2025)

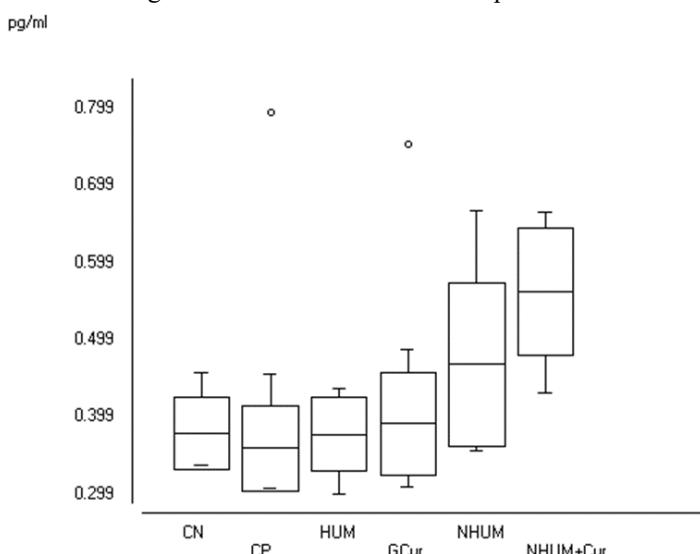
Não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os grupos após teste de Dunn.

### 3.3 IL-4

O grupo CN apresentou uma média de  $0,3813 \pm 0,04673$  pg/ml para IL-4, enquanto o CP teve uma média de  $0,4413 \pm 0,07936$  pg/ml. O grupo tratado com Curcumina (GCur) apresentou uma média de  $0,3763 \pm 0,04749$  pg/ml. Os grupos tratados com  $\alpha$ -Humuleno (HUM) e nanopartículas de  $\alpha$ -Humuleno (NHUM) registraram médias de  $0,4363 \pm 0,14050$  e  $0,4113 \pm 0,16111$  pg/ml, respectivamente. Já o grupo tratado com nanopartículas de  $\alpha$ -Humuleno e Curcumina (NHUM+Cur) apresentou um aumento significativo, com média de  $0,5613 \pm 0,08408$  pg/ml. Diferenças estatisticamente significativas foram observadas entre os grupos CN/NHUM+Cur, CP/NHUM+Cur e

HUM/NHUM+Cur ( $p<0,05$ ), sugerindo que o tratamento combinado foi eficaz em aumentar os níveis de IL-4, indicando uma resposta anti-inflamatória mais robusta.

Figura 3 - Média e Desvio Padrão para IL-4.



Fonte: Autor (2025)

Foi observada diferença estatisticamente significativa após teste de Dunn entre os grupos CN/NHUM+Cur, CP/NHUM+Cur e HUM/NHUM+Cur para  $p<0,05$ .

#### 4 DISCUSSÃO

Os resultados do presente estudo apresentam evidências sólidas acerca dos efeitos neuroprotetores das formulações de nanopartículas de alfa-humuleno e curcumina na modulação da neuroinflamação associada à DA. As reduções significativas nas citocinas pró-inflamatórias, especialmente TNF- $\alpha$ , juntamente com o aumento dos níveis da citocina anti-inflamatória IL-4, indicam que esses tratamentos podem alterar de forma eficaz a resposta neuroinflamatória para um fenótipo mais favorável. Este achado é consistente com pesquisas anteriores que indicam que a curcumina e o alfa-humuleno possuem fortes propriedades anti-inflamatórias, demonstrando mitigar a neuroinflamação em vários modelos de doenças neurodegenerativas (DUAN et al., 2023; LEE et al., 2020).

A eficácia observada na formulação de nanopartículas está alinhada com a crescente literatura que defende o uso da nanotecnologia em sistemas de entrega de medicamentos para superar os desafios impostos pela BHE. As nanopartículas têm demonstrado aumentar a biodisponibilidade dos agentes terapêuticos e facilitar sua entrega direcionada ao SNC (ASIMAKIDOU et al., 2024; DUAN et al., 2023; OLIVEIRA; PIENIZ, 2024; WENDLER et al., 2024). Os resultados mostram que o

diâmetro das nanopartículas variou conforme o composto encapsulado. As nanopartículas contendo ambos os compostos, curcumina e  $\alpha$ -humuleno, apresentaram um diâmetro maior (351,1 nm), o que pode ser explicado pela maior complexidade da matriz de encapsulamento ao acomodar dois princípios ativos simultaneamente. Esse aumento de tamanho também está associado a um PDI mais elevado (0,482), sugerindo uma distribuição de tamanhos mais heterogênea.

O potencial zeta, indicador de estabilidade coloidal, variou de forma significativa entre as amostras. As nanopartículas contendo apenas  $\alpha$ -humuleno tiveram o maior potencial zeta negativo (-36,2 mV), indicando uma boa estabilidade da suspensão. Já as nanopartículas contendo tanto curcumina quanto  $\alpha$ -humuleno apresentaram o menor potencial zeta (-40 mV), o que pode indicar uma menor estabilidade devido à interação entre os dois compostos encapsulados. Em relação à eficiência de encapsulamento, as nanopartículas demonstraram alta eficiência em todas as formulações, com valores de 91% para o  $\alpha$ -humuleno e 95% para a curcumina, tanto nas amostras individuais quanto nas formulações combinadas. Esses resultados confirmam a viabilidade da zeína como material de encapsulamento para esses compostos, mantendo altos níveis de encapsulamento independentemente da combinação.

Os dados sugerem que a combinação de curcumina e  $\alpha$ -humuleno nas mesmas nanopartículas influencia as propriedades físicas da formulação, como diâmetro e potencial zeta, enquanto a eficiência de encapsulamento permanece elevada, indicando a possibilidade de aplicações eficazes em sistemas de liberação controlada. Os achados deste estudo reforçam a ideia de que sistemas de entrega de medicamentos baseados em nanopartículas (NDDS) podem desempenhar um papel crucial no tratamento da DA, melhorando a eficácia terapêutica de compostos como a curcumina e o alfa-humuleno.

Contudo, este estudo apresenta algumas limitações. O tamanho amostral relativamente pequeno pode restringir a generalização dos achados. Além disso, a duração do tratamento e do período de observação pode não refletir adequadamente os efeitos a longo prazo das terapias. Estudos futuros devem incluir tamanhos amostrais maiores e períodos de observação mais longos para avaliar melhor a durabilidade dos efeitos terapêuticos. Ademais, embora a análise das citocinas tenha fornecido informações valiosas sobre a resposta inflamatória, uma avaliação mais abrangente, incorporando biomarcadores adicionais de neuroinflamação, poderia oferecer uma compreensão mais profunda dos mecanismos subjacentes.

Um achado inesperado foi a ausência de variação estatisticamente significativa nos níveis de IL-1 entre os grupos de tratamento. Isso sugere a existência de mecanismos regulatórios complexos que controlam a expressão de IL-1 e seu papel na neuroinflamação crônica. Pesquisas adicionais são

necessárias para esclarecer a dinâmica temporal da expressão de citocinas após o tratamento, particularmente no contexto de estados crônicos de neuroinflamação.

Futuras investigações também devem explorar os potenciais efeitos sinérgicos da combinação de alfa-humuleno e curcumina com outros agentes terapêuticos. Estudar os mecanismos pelos quais esses compostos exercem seus efeitos pode fornecer informações valiosas sobre seu potencial como terapias multi-alvo para a DA.

## 5 CONCLUSÃO

Em conclusão, este estudo demonstra que as formulações de nanopartículas de alfa-humuleno e curcumina modulam significativamente as respostas neuroinflamatórias em um modelo experimental de doença de Alzheimer. Os achados destacam o potencial desses compostos como agentes terapêuticos, especialmente no contexto de sua capacidade de alterar os perfis de citocinas associados à neuroinflamação. Dadas as limitações dos tratamentos farmacológicos atuais para a DA, os resultados defendem uma maior exploração de terapias alternativas combinadas com nanotecnologia como estratégias inovadoras para neuroproteção. A pesquisa contínua é essencial para elucidar os mecanismos de ação subjacentes e otimizar os protocolos de tratamento, pavimentando o caminho para novas intervenções terapêuticas no manejo de doenças neurodegenerativas.

## REFERENCIAS

- ABOZAID, O. A. R. et al. Resveratrol-Selenium Nanoparticles Alleviate Neuroinflammation and Neurotoxicity in a Rat Model of Alzheimer's Disease by Regulating Sirt1/miRNA-134/GSK3 $\beta$  Expression. *Biological Trace Element Research*, v. 200, n. 12, p. 5104–5114, 21 dez. 2022.
- AHLAWAT, J. et al. Nanocarriers as Potential Drug Delivery Candidates for Overcoming the Blood–Brain Barrier: Challenges and Possibilities. *ACS Omega*, v. 5, n. 22, p. 12583–12595, 9 jun. 2020.
- ALOTAIBI, B. S. et al. Potential of Nanocarrier-Based Drug Delivery Systems for Brain Targeting: A Current Review of Literature. *International Journal of Nanomedicine*, v. 16, p. 7517–7533, nov. 2021.
- ANTÔNIO, E. et al. Poly(lactic acid) nanoparticles loaded with ursolic acid: Characterization and in vitro evaluation of radical scavenging activity and cytotoxicity. *Materials Science and Engineering: C*, v. 71, p. 156–166, fev. 2017.
- ASIMAKIDOU, E. et al. Blood–Brain Barrier-Targeting Nanoparticles: Biomaterial Properties and Biomedical Applications in Translational Neuroscience. *Pharmaceuticals*, v. 17, n. 5, p. 612, 10 maio 2024.
- BECHER, B.; SPATH, S.; GOVERMAN, J. Cytokine networks in neuroinflammation. *Nature Reviews Immunology*, v. 17, n. 1, p. 49–59, 5 jan. 2017.
- BORASCHI, D. et al. Cause or consequence? The role of IL-1 family cytokines and receptors in neuroinflammatory and neurodegenerative diseases. *Frontiers in Immunology*, v. 14, 8 maio 2023.
- BORDOLOI, S. et al. Some promising medicinal plants used in Alzheimer's disease: an ethnopharmacological perspective. *Discover Applied Sciences*, v. 6, n. 5, p. 215, 16 abr. 2024.
- BREIJYEH, Z.; KARAMAN, R. Comprehensive Review on Alzheimer's Disease: Causes and Treatment. *Molecules*, v. 25, n. 24, p. 5789, 8 dez. 2020.
- DISABATO, D. J.; QUAN, N.; GODBOUT, J. P. Neuroinflammation: the devil is in the details. *Journal of Neurochemistry*, v. 139, n. S2, p. 136–153, 4 out. 2016.
- DUAN, L. et al. Nanoparticle-Based Drug Delivery Systems: An Inspiring Therapeutic Strategy for Neurodegenerative Diseases. *Polymers*, v. 15, n. 9, p. 2196, 5 maio 2023.
- GALEA, E.; GRAEBER, M. B. Neuroinflammation: The Abused Concept. *ASN Neuro*, v. 15, 30 jan. 2023.
- KONSMAN, J. Cytokines in the Brain and Neuroinflammation: We Didn't Starve the Fire! *Pharmaceuticals*, v. 15, n. 2, p. 140, 25 jan. 2022.
- LEE, J. et al. Herbal medicine treatment for Alzheimer disease. *Medicine*, v. 99, n. 33, p. e21745, 14 ago. 2020.
- LENG, F.; EDISON, P. Neuroinflammation and microglial activation in Alzheimer disease: where do we go from here? *Nature Reviews Neurology*, v. 17, n. 3, p. 157–172, 14 mar. 2021.

LIU, L. Y. et al. Microstructure and Superconductivity of Bi/Ni bilayers Prepared by Pulsed Laser Deposition. *Microscopy and Microanalysis*, v. 23, n. S1, p. 778–779, 4 jul. 2017.

MIRI, M. L. et al. Altered hippocampal interneuron activity precedes ictal onset. *eLife*, v. 7, 2 nov. 2018.

NAGORI, K. et al. Unlocking the Therapeutic Potential of Medicinal Plants for Alzheimer's Disease: Preclinical to Clinical Trial Insights. *Future Pharmacology*, v. 3, n. 4, p. 877–907, 13 nov. 2023.

OLIVEIRA, J. T.; PIENIZ, S. Curcumin in Alzheimer's Disease and Depression: Therapeutic Potential and Mechanisms of Action. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v. 67, 2024.

PINHEIRO, R. G. R. et al. Nanoparticles for Targeted Brain Drug Delivery: What Do We Know? *International Journal of Molecular Sciences*, v. 22, n. 21, p. 11654, 28 out. 2021.

SASTRI, K. T. et al. Nanocarrier facilitated drug delivery to the brain through intranasal route: A promising approach to transcend bio-obstacles and alleviate neurodegenerative conditions. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, v. 75, p. 103656, set. 2022.

SUN, C.; DAI, L.; GAO, Y. Interaction and formation mechanism of binary complex between zein and propylene glycol alginate. *Carbohydrate Polymers*, v. 157, p. 1638–1649, fev. 2017.

TANG, W. et al. Emerging blood–brain-barrier-crossing nanotechnology for brain cancer theranostics. *Chemical Society Reviews*, v. 48, n. 11, p. 2967–3014, 2019.

THAKUR, S. et al. Neuroinflammation in Alzheimer's Disease: Current Progress in Molecular Signaling and Therapeutics. *Inflammation*, v. 46, n. 1, p. 1–17, 20 fev. 2023.

VAISERMAN, A.; KOLIADA, A.; LUSHCHAK, O. Neuroinflammation in pathogenesis of Alzheimer's disease: Phytochemicals as potential therapeutics. *Mechanisms of Ageing and Development*, v. 189, p. 111259, jul. 2020.

WANG, C. et al. The effects of microglia-associated neuroinflammation on Alzheimer's disease. *Frontiers in Immunology*, v. 14, 22 fev. 2023.

WANG, L. et al. Micro-Nanocarriers Based Drug Delivery Technology for Blood-Brain Barrier Crossing and Brain Tumor Targeting Therapy. *Small*, v. 18, n. 45, 14 nov. 2022.

WANG, W.-Y. et al. Role of pro-inflammatory cytokines released from microglia in Alzheimer's disease. *Annals of Translational Medicine*, v. 3, n. 10, p. 136, jun. 2015.

WENDLER, S. A. et al. Anti-Inflammatory Effects of Nanoparticles Containing Alpha-Humulene in a Model of Alzheimer's Disease. *Journal of Advances in Medicine and Medical Research*, v. 36, n. 1, p. 115–128, 1 fev. 2024.

WU, D. et al. The blood–brain barrier: Structure, regulation and drug delivery. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, v. 8, n. 1, p. 217, 25 maio 2023.