



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
CAMPUS UNIVERSITÁRIO MINISTRO PETRÔNIO PORTELLA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**Desenvolvimento e caracterização de uma formulação farmacêutica lipossomal contendo
nimodipina: ensaios pré-clínicos com ênfase em transtornos psicossociais**

GISELLE ZAYRA DA SILVA DE OLIVEIRA

Teresina–Piauí

2013

GISELLE ZAYRA DA SILVA DE OLIVEIRA

Desenvolvimento e caracterização de uma formulação farmacêutica lipossomal contendo nimodipina: ensaios pré-clínicos com ênfase em transtornos psicossociais

Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas do Departamento de Bioquímica e Farmacologia da Universidade Federal do Piauí, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Prof^ª. Dra. Hercília Maria Lins Rolim

Co-Orientador: Prof. Dr. Rivelilson Mendes de Freitas

Teresina – Piauí

2013

GISELLE ZAYRA DA SILVA DE OLIVEIRA**Desenvolvimento e caracterização de uma formulação farmacêutica lipossomal contendo nimodipina: ensaios pré-clínicos com ênfase em transtornos psicossociais**

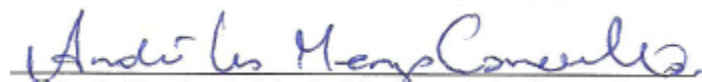
Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas do Departamento de Bioquímica e Farmacologia da Universidade Federal do Piauí, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em: 12/08/2013

BANCA EXAMINADORA

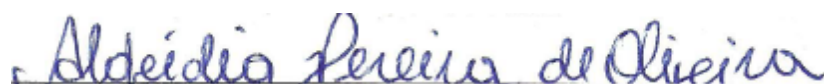
Prof.^a. Dra. Hercília Maria Lins Rolim (Orientadora)

Campus Senador Helvídio Nunes de Barros-UFPI



Prof. Dr. André Luís Menezes Carvalho (1^a Examinador)

Campus Ministro Petrônio Portella-UFPI



Prof.^a. Dra. Aldeídia Pereira de Oliveira (Examinadora Externo)

Campus Doutor Amílcar Ferreira Sobral-UFPI

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ

REITOR

Prof. Dr. José Arimatéia Dantas Lopes

VICE-REITOR

Prof^ª. Dra. Nadir do Nascimento Nogueira

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA

Prof. Dr. Pedro Vilarinho castelo Branco

PRÓ-REITOR DE PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Dr. Helder Nunes da Cunha

DIRETORA DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Prof^ª. Dra. Regina Ferraz Mendes

**COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS**

Prof. Dr. Lívio César Cunha Nunes

“Ainda que minha mente e o meu corpo enfraqueçam, Deus é a minha força, ele é tudo o que eu sempre preciso”

Salmo 73:26

“Tudo o que um sonho precisa para ser realizado é alguém que acredite que ele possa ser realizado”

Roberto Shinyashiki



Dedicatoria

Dedico a conclusão de mais uma etapa de minha vida a Deus por estar sempre ao meu lado, sempre olhar com carinho para mim e permitir que eu chegasse até aqui com saúde e fé!

Aos meus pais que me deram a felicidade e a graça de conviver em família e me repassaram com quanta sabedoria todos os seus valores e ensinamentos, como esse sonho realizado também é de vocês, dedico os esse trabalho e toda minha vida, tudo isso foi por vocês e para vocês! Meus pais.

Agradecimentos

“... E o tempo avança e a gente agradece... pela vida. Vida de sonhos, verdades, alegrias, de dores, amores e luz. Tenta, mesmo que ao momento seja só lembranças. Viva de forma que seja mistério, incertezas, de luta, de paz e de amor.” Cartola

Agradeço infinitamente a **Deus** pelas coisas boas que fez e faz todos os dias da minha vida e por me dar força para lutar pelos meus sonhos.

Aos meus pais, **Maria do Livramento da Silva de Oliveira e Álvaro Ramos de Oliveira** por sempre estarem presente, por seus cuidados e pelo amor incondicional! Vocês são a razão para eu prosseguir!

A minha irmã **Ana Gabriele da Silva de Oliveira** por alegrar meus dias e compartilhar todos os momentos de minha vida.

Aos meus **avós, tios e primos** por fazerem de mim a pessoa mais amada desse mundo, agradeço muito a Deus por ter nascido nessa família, e se pudesse escolher, escolheria mil vezes vocês!

Á minha orientadora, **Prof^ª. Dra. Hercília Maria Lins Rolim** por ter acreditado no meu potencial e sempre ter me encorajado a prosseguir durante todo o andamento desse projeto.

Ao meu co-orientador, **Prof. Dr. Rivelilson Mendes de Freitas** por transmitir com sabedoria, paciência e entusiasmo seus conhecimentos, dos quais sou muito grata.

A todos os **professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas** pelos conhecimentos e vivências compartilhados e à **Prof^ª. Dra. Nereide Stela Santos Magalhães** da Universidade Federal do Pernambuco por ter cedido tão gentilmente a infraestrutura necessária para formulação e caracterização dos lipossomas.

Ao **Prof. Dr. André Luís Menezes Carvalho** e à **Prof^ª. Dra. Aldeídia Pereira de Oliveira** por terem aceitado prontamente o convite para participar da minha banda de defesa de dissertação, e também ao **Prof. Dr. Giovanny Rebouças Pinto** pelas suas importantes considerações dadas na minha qualificação.

Aos **todos os meus colegas de mestrados**, em especial a Thalitta, Mônica e Rosana, por termos compartilhado tantas emoções e experiências ao longo desse um ano e meio de mestrado.

Á todos os meus colegas do **Laboratório em Pesquisa Neuroquímica Experimental (LAPNEX)** por ter acrescentado tanto na minha vida profissional e pessoal, é muito bom fazer parte dessa família!

À todos os **meus amados amigos**, em especial a **Fernanda, Jéssica, Karlene, Rafaela e Gabriel**, por fazerem parte da minha vida desde a infância, por tanto amor, carinho, companheirismo e por entenderem tão bem meus sentimentos.

Ao **Jackson Castro**, pelo seu amor, por me fazer ainda mais feliz, por ter acreditado e compartilhado de todos os momentos da realização desse sonho.

E ainda ao **CNPq,FAPEPI e CAPES** por todo apoio financeiro direcionado a realização desse projeto.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS	xi
LISTA DE ILUSTRAÇÕES	xiii
LISTA DE TABELAS	xv
RESUMO	xvi
ABSTRACT	xvii
1. INTRODUÇÃO	18
2. OBJETIVOS	20
2.1 Objetivo Geral.....	20
2.2 Objetivos Específicos.....	20
3. REVISÃO DE LITERATURA	21
3.1 Transtornos de ansiedade.....	21
3.2 Diidropiridinas-Antagonistas dos Canais de Cálcio.....	22
3.3 Nimodipina	23
3.4 Nanotecnologia: uso dos lipossomas.....	24
3.5 Lipossomas contendo nimodipina.....	25
Referências.....	26
4. CAPÍTULO I: Os principais avanços científicos das preparações farmacêuticas lipossomais com efeitos antioxidantes e neuroprotetores	31
Resumo	31
Abstract.....	32
Introdução.....	33
Material e Métodos.....	34
Resultados e discussão.....	35
Conclusão.....	46
Referências.....	46
5. CAPÍTULO II: Investigação do mecanismo de ação ansiolítico de uma formulação lipossomal contendo nimodipina	50
Resumo.....	50
Abstract.....	51
Introdução.....	52
Material e Métodos.....	53

Resultados e discussão.....	57
Conclusão.....	68
Referências.....	68
6. CAPÍTULO III: Avaliação do potencial antioxidante <i>in vitro</i> de uma formulação lipossomal contendo nimodipina.....	74
Resumo	74
Abstract.....	75
Introdução.....	76
Material e Métodos.....	78
Resultados e discussão.....	80
Conclusão.....	93
Referências	94
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	98
PRODUÇÃO CIENTÍFICA E TECNOLÓGICA.....	99
ANEXOS	
APÊNDICES	

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AAPH	2,2'-azobis 2-aminopropano
AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
ANOVA	Análise de Variância
BVS	Biblioteca virtual em saúde
CE ₅₀	Concentração efetiva inibitória de 50%
CEEA	Comitê de ética em experimentação animal
CEES	Sulfeto de 2-cloroetil etilo
CO ₂	Dióxido de carbono
CuZnSOD	CuZn superóxido dismutase
DeCS	Descritores em Ciências da Saúde
DNA	Ácido desoxirribonucléico
E.P.M.	Erro padrão da média
ERNS	Espécies reativas derivadas de nitrogênio
EROS	Espécies reativas derivadas de oxigênio
ERSS	Espécies reativas derivadas de enxofre
FeSO ₄	Sulfato ferroso
FLU	Flumazenil
GABA	Ácidogama-aminobutírico
GSH	Glutationa
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
Hep3B	Linhagens celulares do carcinoma hepatocelular
HepG2	Linhagens celulares do carcinoma hepatocelular
HNO ₂	Ácido nitroso
i.p.	Via intraperitoneal
I/R	Isquemia/ Reperfusão
L•	Radical lipídico
LCE	Labirinto em cruz elevado
LCNa	Lipossomas contendo nimodipina
LipLU	Lipossomas contendo luteolina
L-LYC	Lipossomas contendo licopenos
MDA	Malonaldeído
MEDLINE	Literatura Internacional em Ciências da Saúde

N_2	Gás nitrogênio
N_2O	Óxido nitroso
NaOH	Hidróxido de Sódio
NEBA	Número de entradas nos braços abertos
NO	Óxido nítrico
N_2O	Óxido nitroso
NO_2^-	Nitrito
NO_3^-	Nitrato
NPS	Nitroprussiato de sódio
O_2^-	Ânion superóxido
OH•	Radical hidroxila
ONOO ⁻	Peroxinitritos
PubMed	Public Medline
RLs	Radicais livres
RO•	Alcoxilas
ROO•	Radicais peroxila
SNC	Sistema Nervoso Central
SOD	Superóxido dismutase
SUV	Small Unilamellar Vesicles
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TBARS	Espécies reativas com ácido tiobarbitúrico
TPBA	Tempo de permanência no braço aberto

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Capítulo II

Ilustração 1	Figura do Equipamento do Claro/Escuro.....	55
Ilustração 2	Figura do Equipamento do Labirinto de Cruz Elevada.....	56
Ilustração 3	Figura do Equipamento do Campo Aberto.....	56
Ilustração 4	Figura do Equipamento do <i>Rota Rod</i>	57

Capítulo III

Ilustração 1	Gráfico do potencial antioxidante <i>in vitro</i> da nimodipina contra a formação do radical nitrito (NO ₂).....	82
Ilustração 2	Gráfico do potencial antioxidante <i>in vitro</i> da formulação lipossomal contendo nimodipina contra a formação do radical nitrito (NO ₂ ⁻).....	83
Ilustração 3	Gráfico do potencial antioxidante <i>in vitro</i> da nimodipina na remoção de radicais hidroxilas.....	85
Ilustração 4	Gráfico do potencial antioxidante <i>in vitro</i> da formulação lipossomal contendo nimodipina na remoção de radicais hidroxilas.....	85
Ilustração 5	Gráfico do potencial antioxidante <i>in vitro</i> da nimodipina contra a formação de espécies reativas com o ácido tiobarbitúrico (TBARS).....	88
Ilustração 6	Gráfico do potencial antioxidante <i>in vitro</i> da formulação lipossomal contendo nimodipina contra a formação de espécies reativas com o ácido tiobarbitúrico (TBARS).....	89
Ilustração 7	Gráfico da regressão linear da capacidade de inibição de íons nitrito, radicais hidroxilas e TBARS proporcionada por diferentes concentrações de nimodipina.....	90
Ilustração 8	Gráfico da regressão linear da capacidade de inibição de íons	

	nitrito, radicais hidroxilas e TBARS proporcionada por diferentes concentrações de lipossomas contendo nimodipina.....	90
Ilustração 9	Figura da propriedade antioxidante da nimodipina.....	91
Ilustração 10	Figura do possível mecanismo de sequestro de radicais livres pela nimodipina.....	91
Ilustração 11	Figura da interação da nimodipina com os lipídios dos lipossomas.....	92

LISTA DE TABELAS

Capítulo I

Tabela 1	Artigos encontrados e selecionados de acordo com as bases eletrônicas e as palavras-chave utilizadas.....	35
Tabela 2	Caracterização dos artigos selecionados de acordo com os respectivos autores, objetivos, conclusões, anos de publicação e substâncias encapsuladas.....	42

Capítulo II

Tabela 1	Efeitos da nimodipina, formulação lipossomal contendo nimodipina (LCNa), flumazenil, diazepam e suas associações em camundongos no teste do claro/escuro.....	60
Tabela 2	Efeitos da nimodipina, formulação lipossomal contendo nimodipina (LCNa), flumazenil, diazepam e suas associações em camundongos no teste do labirinto em cruz elevada.....	62
Tabela 3	Efeitos da nimodipina, formulação lipossomal contendo nimodipina (LCNa), flumazenil, diazepam e suas associações em camundongos no teste do campo aberto.....	65
Tabela 4	Efeitos da nimodipina, formulação lipossomal contendo nimodipina (LCNa), flumazenil, diazepam e suas associações em camundongos no teste do <i>rota rod</i>	67

Desenvolvimento e caracterização de uma formulação farmacêutica lipossomal contendo nimodipina: ensaios pré-clínicos com ênfase em transtornos psicossociais. GISELLE ZAYRA DA SILVA DE OLIVEIRA. Orientadora: Hercília Maria Lins Rolim. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Centro de Ciências da Saúde. Departamento de Bioquímica e Farmacologia, UFPI, 2013.

RESUMO

A nimodipina é um fármaco pertencente à classe das diidropiridina que atua como bloqueador dos canais de cálcio tipo L e por apresentar elevada lipofilidade ultrapassa facilmente a barreira hematocefálica, proporcionando uma vasodilatação mais eficaz nos vasos sanguíneos cerebrais. No entanto, esse medicamento possui várias características farmacocinéticas que limitam seu emprego na prática clínica. Nesse sentido, alguns trabalhos demonstram que a intervenção da nanotecnologia farmacêutica é um instrumento útil para aperfeiçoamento dessas propriedades, como é o caso do encapsulamento da nimodipina em lipossomas. Contudo, não existem trabalhos que apresentem resultados referentes ao potencial ansiolítico e neuroprotetor de lipossomas contendo nimodipina. Atendendo a esse propósito, a presente dissertação tem o intuito de avaliar o mecanismo de ação ansiolítico de lipossomas contendo nimodipina (LCNa) e analisar seu potencial antioxidante *in vitro*. Porém de forma inicial foi realizada, no primeiro capítulo, uma revisão sistemática de literatura com o objetivo de verificar as publicações científicas, em forma de artigos, divulgadas nos dez últimos anos sobre os benefícios científicos proporcionados por preparações lipossomais com efeitos neuroprotetores e/ou antioxidantes, utilizando as bases de dados eletrônicas Science Direct, BVS (Biblioteca Virtual em Saúde), PubMed e Scielo. Os resultados dessa pesquisa indicaram que o desenvolvimento de lipossomas direcionados para a promoção desses efeitos representam uma crescente a partir de 2008, ano de maior quantidade de publicações, de modo que desse ano até a atualidade se concentram 61,5% dos artigos publicados sobre a temática do estudo. Com a presença marcante dos compostos isolados de plantas medicinais, em especial a quercetina. Já no segundo capítulo foi avaliado o mecanismo de ação ansiolítico dos LCNa, por meio da utilização dos testes comportamentais claro/escuro e labirinto em cruz elevada, bem como a atividade e coordenação motora por meio dos testes de campo aberto e *rota rod*. Este estudo teve como resultado a constatação do potencial ansiolítico dos lipossomas, com ação superior a das soluções de nimodipina livre, sem apresentar sedação ou relaxamento muscular. Além de ser evidenciado também que os LCNa atuam por meio do sistema GABAérgico para promoverem os efeitos ansiolíticos relatados. Por fim, no terceiro capítulo foi analisado o potencial antioxidante *in vitro* da nimodipina livre e do LCNa em proteger contra a ocorrência de per oxidação lipídica, remover os radicais hidroxilas e reduzir a produção do íon nitrito. Dessa forma, foi verificado que todas as concentrações de LCNa foram capazes de prevenir a formação de íons nitritos e de remover as substâncias reativas com ácido tiobarbitúrico de forma mais eficiente que a nimodipina livre. Apenas um parâmetro, na avaliação da remoção dos radicais hidroxilas, foi visto que a nimodipina isolada apresentava melhor efeito do que sua forma lipossomal, demonstrando ser uma formulação promissora, havendo a necessidade da continuação desses estudos com testes *in vivo* para que seja confirmado o efeito antioxidante e realização de experimentos para analisar a segurança da administração dessa formulação para o tratamento da ansiedade e de morbidades que podem estar relacionadas ou não com o estresse oxidativo.

Palavras-chave: Ansiolítico; Antioxidante; Lipossoma; Nanotecnologia; Neurofarmacologia; Nimodipina.

Development and characterization of a pharmaceutical formulation containing liposomal nimodipine: pre-clinical trials with emphasis on psychosocial disorders. GISELLE ZAYRA DA SILVA DE OLIVEIRA. Advisor: Hercília Maria Lins Rolim. Master's Dissertation. Post-Graduate Program in Pharmaceutical Sciences. Center for Health Sciences. Department of Biochemistry and Pharmacology, UFPI, 2013.

ABSTRACT

Nimodipine is a drug of the class of dihydropyridine which acts as a blocker of L-type calcium channels. It has high lipophilicity and easily exceeds the blood-brain barrier, providing a more effective vasodilation in the blood vessels of the brain. However, this drug has several pharmacokinetic characteristics which limit its use in clinical practice. In this sense, some studies show that the intervention of pharmaceutical nanotechnology is a useful tool for improving these properties, such as the encapsulation of nimodipine in liposomes. Although, there aren't papers that present related results for the neuroprotective and anxiolytic potential of liposomes containing nimodipine. Given this purpose, this dissertation aims to evaluate the mechanism of action of anxiolytic liposomes containing nimodipine (LCNa) and analyze its antioxidant potential *in vitro*. Yet the initial form was performed, in the first chapter a systematic review of the literature with the aim of verifying scientific publications in the form of articles published in the last ten years about the scientific benefits provided by liposomal preparations with antioxidant and/or neuroprotective, using bases electronic databases Science Direct, VHL (Virtual Health Library), PubMed and SciELO. The results of this study indicated that the development of targeted liposomes to promote antioxidant and neuroprotective effects increasing since 2008, the year of highest number of publications, this year to the present is concentrate 61.5% of the articles published on the subject of the study. With the marked presence of compounds isolated from medicinal plants, especially quercetin. In the second chapter we evaluated the mechanism of action of anxiolytic LCNa through the use of behavioral test light/dark and elevated plus maze, as well as the activity and motor coordination through field tests and *rota rod*. This was as a result of the finding anxiolytic potential of liposomes with action than the solutions of nimodipine without giving sedation or muscle relaxation, so that was also confirmed that the mechanism of anxiolytic action of these liposomes can happen by GABAergic system, since the use of the GABA antagonist, flumazenil, reversed the effects of LCNa in all pharmacological models used. Finally, the third section was analyzed *in vitro* antioxidant potential of nimodipine free and LCNa in protecting against the occurrence of lipid peroxidation, removal of hydroxyl radical and reduction of the production of nitrite ion. Thus, it was found that all concentrations of LCNa were able to prevent the formation of nitrite ions and removing the thiobarbituric acid reactive substances more efficiently than nimodipine free. Only one parameter, the evaluation of the removal of hydroxyl radicals it was seen that the nimodipine alone had better effect than a liposomal form, showing to be a promising formulation, with the need for continuation of these studies within *in vivo* tests to be confirmed the antioxidant effect, in addition to performing other experiments to examine the safety of administration of this formulation in the application of the treatment of anxiety and disorders that may be related or not with oxidative stress.

Keywords: Anxiolytic; Antioxidant; Liposome; Nanotechnology; Neuropharmacology; Nimodipine.

1 INTRODUÇÃO

A avaliação da eficiência da utilização de antagonistas dos canais de cálcio para o tratamento de patologias que acometem o sistema nervoso central vem despertando o interesse de diversos pesquisadores há algumas décadas, com especial destaque para a classe das diidropiridinas. Esses medicamentos atuam bloqueando os canais de cálcio voltagem dependente tipo L, impedindo o fluxo de cálcio para o interior das células musculares cardíacas e da musculatura lisa vascular, o que propicia maior vasodilatação nessas regiões, porém com as diidropiridinas essa ação ocorre de maneira mais efetiva sobre a musculatura vascular (KUO et al., 2010; ASLAN et al., 2012).

Como é o caso da nimodipina, fármaco pertencente à classe das diidropiridinas, que por apresentar elevada lipofilidade ultrapassa a barreira hematocefálica facilmente, proporcionando uma vasodilatação e consequente perfusão cerebral de forma mais eficaz, o que significa maior oxigenação e melhor circulação de nutrientes para essas áreas. Além de impedir que o fluxo de cálcio ocorra de maneira excessiva para o interior dos neurônios, evitando a excitação neuronal e a liberação desregulada dos neurotransmissores envolvidos na mediação da ansiedade. Existem relatos também que indicam que a nimodipina, assim como outros antagonistas dos canais de cálcio, exerce importante efeito neuroprotetor e antioxidante, muito útil no tratamento da ansiedade, visto que nessa morbidade ocorre elevação do processo oxidativo cerebral (HOVATTA; JUHILA; DONNER, 2010; RECKZIEGEL et al., 2011; ASLAN et al., 2012).

Entretanto, é sabido que a nimodipina apresenta limitada atividade farmacológica em virtude de algumas de suas características farmacocinéticas, como é o caso do seu elevado mecanismo de primeira passagem hepática e de sua baixa biodisponibilidade oral, que fazem com que sejam necessárias elevadas doses para alcançar os efeitos farmacológicos desejados, fator que é responsável pelo aumento das chances de toxicidade para os indivíduos que fazem uso desse medicamento. Além disso, são conhecidas também as dificuldades de sua administração clínica, uma vez que sua baixa solubilidade em água restringe sua utilização na prática médica (XIANG et al., 2009).

Desse modo, existe a necessidade do desenvolvimento de formulações de nimodipina que demonstrem maior eficácia e segurança, sendo uma opção relevante a intervenção farmacológica com ênfase em nanotecnologia farmacêutica para aprimorar o perfil farmacocinético e farmacodinâmico desse fármaco.

É nessa tendência que surge a importância dos lipossomas, nanossistemas ideais para superar as limitações desse medicamento. De modo a oferecer maior proteção ao

medicamento, como redução da frequência de administração e melhoria do perfil farmacocinético das moléculas. Outro benefício significativo é a liberação controlada do fármaco, uma vez que esta aumenta a sua biodisponibilidade, por manter os níveis séricos do medicamento constante, o que diminui as chances de toxicidade e aumenta a adesão do paciente a terapêutica (CHEN et al., 2010). Essas vantagens enfatizam a relevância da utilização terapêutica de lipossomas contendo nimodipina para o tratamento de diversas doenças, em especial as que possuem um maior nível de cronicidade como é o caso da ansiedade, em que há necessidade da intervenção terapêutica por longos períodos.

Nesse sentido, a continuação das pesquisas com lipossomas de nimodipina são os maiores motivadores dessa dissertação que teve como objetivo no primeiro capítulo realizar uma revisão sistemática de literatura sobre os principais avanços científicos das formulações farmacêuticas lipossomais com efeitos neuroprotetores e antioxidantes. Enquanto que no segundo capítulo foi abordada a avaliação do mecanismo de ação ansiolítico dos lipossomas contendo nimodipina (LCNa) e no terceiro capítulo foi verificado o potencial antioxidante *in vitro* desses lipossomas. Esses resultados estão sendo investigados de forma pioneira e tem a intenção de ampliar o conhecimento farmacológico sobre essa preparação farmacêutica que já vem demonstrando prósperos resultados, conforme pode ser verificado pelo pedido de depósito de registro de patente submetido com o número de processo BR 10 2012 021840 2 junto ao INPI (Instituto Nacional da Propriedade Industrial), realizados pelo grupo de pesquisa

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

- Desenvolver uma formulação farmacêutica lipossomal contendo nimodipina, bem como investigar seu mecanismo de ação ansiolítico e seu potencial antioxidante *in vitro*.

2.2 Objetivos Específicos

- Realizar uma revisão sistemática de literatura sobre os principais avanços científicos de formulações farmacêuticas lipossomais que apresentem efeitos neuroprotetores e antioxidantes
- Produzir lipossomas unilamelares pequenos (SUV) de nimodipina com características físico-químicas e alta taxa de encapsulação adequadas para a realização de testes *in vivo*, com tamanho, homogeneidade e alto rendimento de fármaco encapsulado.
- Esclarecer o mecanismo de ação envolvido na ação ansiolítica (claro/escuro e labirinto em cruz elevado) e nos efeitos sobre a atividade locomotora (campo aberto) e coordenação motora (*rota rod*) dos lipossomas contendo nimodipina (LCNa) sobre sistema nervoso de camundongos.
- Avaliar o potencial antioxidante *in vitro* de diferentes concentrações de nimodipina e de LCNa por meio de sua capacidade de remover espécies reativas com ácido tiobarbitúrico (TBARS) e radicais hidroxilas, bem como inibir a produção de íons nitrito.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Transtornos de ansiedade

A ansiedade é considerada o transtorno psiquiátrico de maior incidência em nível global, sendo caracterizada pela fobia desproporcional frente a situações que representem estresse, perigo, ameaças reais ou desafios cotidianos. Entretanto, pode ser manifestada também na ausência de perigo real. Possuem componentes fisiológicos e psicológicos com sintomas emocionais, perceptivos, somáticos, cognitivos e comportamentais, podendo inclusive culminar na falência da capacidade adaptativa. De acordo com dados da literatura, a ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal é responsável pela ocorrência de sintomas neurovegetativos muito comuns da ansiedade como tremor, tontura, aumento da frequência respiratória, tensão muscular, insônia, taquicardia, palidez, desordens intestinais e elevação da pressão arterial (BENUTE et al., 2009; BRAGA et al., 2010; RIBEIRO, 2010; RODRIGUES, 2011).

Nesse transtorno estão envolvidos o sistema cerebral de defesa (amígdala, hipotálamo medial e substância cinzenta periaquedutal) e o sistema de inibição comportamental (sistema septohipocampal). No entanto, vários sistemas de neurotransmissão também participam como mecanismos de mediação da ansiedade, é o caso dos sistemas GABAérgico, serotoninérgico, dopaminérgico e neuropeptidérgico, nos quais é possível evidenciar a atuação de diversos neurotransmissores na modulação dos comportamentos defensivos, merecendo destaque a noradrenalina, serotonina, dopamina, ácido gama-aminobutírico (GABA), glicina, fator de liberação de corticotropina, corticotropina, colecistocinina e corticosterona. Nos estados de ansiedade podem ser percebidos a desregulação da liberação desses neurotransmissores (AKIMOVA; LANZENBERGER; KASPER, 2009; DURANT; CHRISTMAS; NUTT, 2010; NIKOLAUS et al., 2011).

A ocorrência de episódios de ansiedade também pode estar relacionada com o consumo de oxigênio anormal e a hipersensibilidade ao CO₂ de indivíduos que são acometidos por essa patologia, por essas condições afetarem intimamente o sistema nervoso autônomo (SARDINHA et al. 2009; MA; RINGSTAD, 2012).

No entanto, existem outros fatores que não estão necessariamente envolvidos com uma causa específica, mas também podem contribuir para a sensibilidade do indivíduo frente a ameaças, como os casos das difíceis condições de criação, da falta de cuidados maternos no momento Peri natal ou da separação materna precoce. Essas também são situações que podem aumentar a ansiedade desses sujeitos quando atingirem a vida adulta (BELZUNG; GRIEBEL, 2001).

Nesse sentido, a ansiedade patológica deve ser considerada um problema de saúde pública, em virtude do seu progressivo crescimento na população e do seu elevado potencial comprometedora da qualidade de vida dos indivíduos, seja em suas relações pessoais, sociais ou profissionais (GONÇALVES, KAPCZINSKI; 2008).

A ansiedade patológica acomete 10 a 30% da população de modo debilitante (MULUMO et al., 2012), sendo os tipos de transtornos mais comuns a ansiedade generalizada, o estresse pós-traumático, o pânico e as desordens obsessivas e compulsivas (ROSA et al., 2012). O tratamento farmacológico destinado para essas patologias demonstra boa resposta clínica, no entanto desencadeiam diversos efeitos adversos, o que desperta a necessidade da busca e desenvolvimento de novos agentes terapêuticos com propriedades ansiolíticas eficazes e com menores efeitos adversos (FAUSTINO; ALMEIDA ANDREATINI, 2010).

Dentro dessa perspectiva, compostos que apresentem potencial antioxidante estão sendo muito investigadas para o tratamento da ansiedade e outros transtornos psicossociais, levando em consideração que nessas patologias ocorrem intenso processo oxidativo cerebral que compromete a função neuronal causando danos ao cérebro, situações que agravam o desenvolvimento e dificulta a recuperação das doenças (BOUAYED; RAMMAL; SOULIMANI, 2009).

3.2 Diidropiridinas - Antagonistas dos Canais de Cálcio

Os antagonistas dos canais de cálcio estão divididos em três classes de fármacos que apresentam diferentes características químicas, é o caso das fenilalquilaminas, diidropiridinas e benzotiazepinas. Esses fármacos atuam bloqueando a entrada de íons de cálcio, por meio de distintos canais, para o interior das células musculares cardíacas e musculares lisa dos vasos. Os canais mais importantes que atuam no sistema cardiovascular são os voltagem-dependente e receptor-dependente. Dois canais voltagem-dependente que se destacam nesse sistema, são os canais tipo T, que a entrada de cálcio para dentro da célula produz corrente elétrica transitória e de menor voltagem e os canais tipo L caracterizados por corrente elétrica de longa ação (LONGO; MARTELLI; ZIMMERMANN, 2011).

Os canais de cálcio dependentes de voltagem estão envolvidos em vários processos fisiológicos, a sua ativação permite que o cálcio entre na célula e possa desempenhar importantes funções como excitação neuronal, liberação de hormônios e neurotransmissores, regulação da expressão gênica e contração muscular (MEDEI et al., 2011).

Os bloqueadores dos canais de cálcio podem ligar-se a subunidade α_1 dos canais de cálcio voltagem-dependente tipo L, em locais diferentes, limitando a entrada de cálcio nas

células. No caso das diidropiridinas o efeito mais pronunciado ocorre sobre o músculo liso vascular agindo como vasodilatador, mas também proporcionam uma diminuição da excitabilidade e da frequência cardíaca (mantendo o débito cardíaco normal) e combate a isquemia tecidual. Esses compostos são bem utilizados no tratamento da hipertensão, angina pectoris, taquicardia supraventricular, enxaquecas, insuficiência cardíaca diastólica, espasmo esofágico, lesões cerebrais, distúrbios cognitivos em idosos, traumatismo craniano, derrame e Mal de Alzheimer (BOMBIG; POVOÁ, 2009; ASLAN et al., 2009).

Esses medicamentos apresentam considerável lipofilicidade, o que facilita sua passagem pela barreira hematoencefálica, fazendo com que haja vasodilação mais efetiva nos vasos cerebrais, com maior fluxo sanguíneo e melhor oxigenação, além de regular a liberação dos neurotransmissores pelos neurônios proporcionando melhor funcionamento cerebral (DRÍGELOVÁ et al. 2009). Dessa forma, esses dados sugerem uma boa aplicação no tratamento da ansiedade, visto que a constrição dos vasos sanguíneos cerebrais é um dos sintomas fisiológicos desse e de outros distúrbios cerebrais (SAAVEDRA; LEMUS; BENICKY, 2011).

Esses benefícios podem ser bastante úteis também em outras patologias que demonstrem lesão cerebral, uma vez que nessas patologias podem ser evidenciadas uma necessidade de consumo de oxigênio maior que o normal, ao tempo que há suprimento sanguíneo diminuído no cérebro. Assim, o tratamento da isquemia pode ser fundamental para promover uma melhora efetiva de diversas condições que comprometem o sistema nervoso central.

No entanto, para produzir efeitos benéficos, as diidropiridinas devem ser administradas em altas doses, o que provoca inúmeras reações adversas. As mais comuns são tontura, hipotensão, rubor facial, cefaléia, náuseas, constipação intestinal, edema periférico, edema pulmonar, tosse, sibilos, câibras musculares, erupções, sonolência e elevações dos marcadores de função hepática (KOHLMANN et al., 2010). Essas consequências poderiam ser minimizadas ou abolidas por meio da melhora da biodisponibilidade desse fármaco.

3.3 Nimodipina

Dentro dessa perspectiva, a utilização da nimodipina, um antagonista seletivo dos canais de cálcio do tipo L, apresenta importantes efeitos sobre a função neural e possui elevada afinidade pelos sítios de membrana do cérebro, de modo que tem sido amplamente investigada no tratamento de inúmeras disfunções que acometem esse órgão. Essa medicação atua preferencialmente nos vasos sanguíneos cerebrais aumentando o fluxo sanguíneo nessa região, sendo utilizada no tratamento de espasmo cerebrovascular, acidente vascular cerebral

e em casos de isquemias presentes em inúmeras patologias que afetam o cérebro (HAILE et al., 2009).

No entanto, alguns experimentos também indicam seu potencial terapêutico no tratamento da epilepsia (MACHADO et al., 2013), depressão (WANKERL et al., 2010) distúrbios de humor (CASAMASSIMA et al., 2010), déficit cognitivo de paciente portadores da Doença de Alzheimer (GHASSAN et al. 2010) e ansiedade (BIALA; KRUK, 2008).

No caso da ansiedade, Gallaguer e colaboradores (2006) indicam que a nimodipina atua na amígdala de modo a desempenhar um papel importante no condicionamento do medo, tendo assim, consideráveis efeitos no tratamento da ansiedade e da aprendizagem emocional. Argumento reforçado por Marino e colaboradores, (1991) que demonstram a eficiente utilização de nimodipina na reversão da situação de estresse psicológico, de modo a confirmar a relação protetora dos bloqueadores de cálcio frente a patologias relacionadas ao estresse.

Desempenhando também uma importante função protetora do sistema nervoso central contra muitos tipos de lesões, uma vez que a passagem de cálcio para o interior da célula, em excesso, pode provocar a morte celular (UEMAETOMARI et al., 2009). A descoberta dessas novas indicações terapêutica tem continuamente despertado o interesse de pesquisadores em comprovar inéditos efeitos cerebrais dessa medicação, bem como aperfeiçoar suas propriedades farmacológicas, utilizando de intervenção biotecnológica com o intuito de ampliar a eficácia e a segurança da nimodipina, como é o caso de sua incorporação em sistemas lipossomais (SUN et al., 2013).

3.4 Nanotecnologia: uso de lipossomas

Os lipossomas são compartimentos aquosos formados por bicamadas concêntricas de fosfolipídios. Esses sistemas nanométricos têm demonstrado bons resultados na encapsulação de fármacos insolúveis, fotossensíveis e citotóxicos. Eles apresentam grande flexibilidade estrutural e tamanhos variam de 50 nm até algumas dezenas de micrômetros. Podem veicular compostos hidrossolúveis no compartimento aquoso e compostos lipossolúveis na bicamada lipídica. Além disso, essas vesículas permitem o melhor direcionamento e penetração dos medicamentos nas células e tecidos (PIMENTEL et al., 2007; KUMAR; BHOWMIK; DEB, 2012).

Eles tendem a se acumular no organismo e esta propriedade tem sido explorada na quimioterapia do câncer, terapia antimicrobiana, vacinas e diagnóstico por imagem. Os resultados têm indicado claramente que alguns lipossomas que encapsulam fármacos e vacinas exibem superior propriedade farmacológica sobre os medicamentos tradicionais (CONCEIÇÃO; MATOS; MOUTINHO, 2010).

Geralmente, os lipossomas são produzidos pelo método de hidratação de filme lipídico, seguido de sonicação ou extrusão que visa diminuir o diâmetro das vesículas lipídicas. Esses nanossistemas podem ser caracterizados de acordo com natureza do material encapsulado, a composição química e o tamanho das vesículas. Já são comercializados desde os anos 80 para o tratamento de câncer e infecções fúngicas sistêmicas, no entanto são necessários mais estudos para solucionar obstáculos de ordem tecnológica e biológica com o intuito de ampliar suas indicações farmacológicas (BATISTA et al., 2007; LIU et al., 2010; ALLEN; CULLIS, 2012).

3.5 Lipossomas contendo nimopidina

O encapsulamento da nimodipina em lipossomas proporcionará um melhor perfil farmacocinético e farmacodinâmico desse fármaco, de modo a aperfeiçoar sua aplicação farmacológica. Segundo Magalhães e Mosqueira (2010) o encapsulamento de fármacos em lipossomas proporciona maior proteção ao medicamento contra a degradação extracelular, reduz a frequência de administração e a duração do tratamento, além de melhorar a seletividade em relação ao alvo. Outro benefício significativo é a liberação controlada do fármaco, uma vez que esta aumenta a sua biodisponibilidade e seu tempo de permanência na circulação por manter os níveis séricos do fármaco constante, uma vez que a nimodipina administrada de forma convencional é rapidamente eliminada do sangue.

De acordo com Wang e colaboradores (2006) os lipossomas contendo nimodipina possuem pequenos tamanhos, alta eficiência de encapsulação e elevada capacidade de solubilizar esse medicamento. Além de possuírem habilidade de entregar nimodipina ao cérebro de forma eficiente, por ser atestada uma correlação linear da concentração da droga no tecido cerebral e no plasma de ratos em concentrações mais elevadas e estáveis, quando comparadas com soluções de nimodipina administradas de forma convencional. Deste modo é percebida uma melhora no perfil farmacocinético da nimodipina, tanto no plasma quanto no tecido cerebral.

A partir disso, surge a importância de se realizar estudos que tenham o objetivo de avaliar a ação neuroprotetora de lipossomas contendo nimodipina e seu potencial para prevenir e tratar doenças que acometem o sistema nervoso central, como é o caso da ansiedade, visto que estudos demonstram promissores resultados referente as características físico-químicas e ao bom direcionamento desses carreadores para as regiões cerebrais.

REFERÊNCIAS

- AKIMOVA, E.; LANZENBERGER, R.; KASPER, S. The Serotonin-1A Receptor in Anxiety Disorders. **Biological Psychiatry**, v. 66, n. 7, p. 627-635, 2009.
- ALLEN, T. M.; CULLIS, P. R. Liposomal drug delivery systems: From concept to clinical applications. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 65, n. 1, p. 36-48, 2013.
- ASLAN, A., GURELIK, M., CEMEK, M., GOKSEL, H. M., BUYUKOKUROGLU, M. E. Nimodipine can improve cerebral metabolism and outcome in patients with severe head trauma. **Pharmacological Research**, v. 59, n. 2, p. 120-124, 2009.
- ASLAN, A.; GURELIK, M.; CEMEK, M.; BUYUKOKUROGLU, M.; GOKSEL, H. M.; ESER, O. Nimodipine can diminish oxidative stress in patients with severe head trauma. **Journal of Neurosurgical Sciences**, v. 56, n. 3, p. 247-253, 2012.
- BATISTA, C.M.; CARVALHO, C.M. B.; MAGALHÃES, N. S. S. Lipossomas e suas aplicações terapêuticas: Estado da arte. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 43, n. 2, p. 167-179, 2007.
- BELZUNG, C.; GRIEBEL, G. Measuring normal and pathological anxiety-like behaviour in mice: a review. **Behavioural Brain Research**, v. 125, n. 1, p. 141-149, 2001.
- BENUTE, G. R. G.; NOMURA, R. M. Y.; PEREIRA, P. P.; LUCIA, M. C. S.; ZUGAIB, M. Spontaneous and induced abortion: anxiety, depression and guilty. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 55, n. 3, p. 322-327, 2009.
- BIALA, G.; KRUK, M. Calcium channel antagonists suppress cross-tolerance to the anxiogenic effects of d-amphetamine and nicotine in the mouse elevated plus maze test. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological**, v. 32, n. 1, p. 54-61, 2008.
- BOMBIG, M. T. N.; PÓVOA, R. Interações e associações de medicamentos no tratamento anti-hipertensivo – antagonistas dos canais de cálcio. **Revista Brasileira de Hipertensão**, v. 16, n. 4, p. 226-230, 2009.
- BOUAYED, J.; RAMMAL, H.; SOULIMANI, R. Oxidative Stress and Anxiety: Relationship and Cellular Pathways. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2, n. 2, p. 63-67, 2009.
- BRAGA, J.E.F.; PORDEUS, L.C.; SILVA, A.T.M.C.; PIMENTA, F.C.F.; DINI, M.F.F.M.; ALMEIDA, R.N.A. Ansiedade Patológica: Bases Neurais e Avanços na Abordagem Psicofarmacológica. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**, v. 14, n. 2, p.93-100, 2010.
- CASAMASSIMA, F.; HAY, F. A. C.; BENEDETTI, A.; LATTANZI, L.; CASSANO, G. B.; PERLIS, R. H.; L-Type Calcium Channels and Psychiatric Disorders: A Brief Review. **American Journal of Medical Genetics**, v. 153, p. 1373-1390, 2010.
- CHEN, C.; HAN, D.; CAI, C.; TANG, X. Na overview of liposome lyophilization and its future potential. **Jornal of Controlled Release**, v. 142, n. 3, p. 299-311, 2010.

CONCEIÇÃO, A. I. F. S.; MATOS, C. M.; MOUTINHO, C. G. Lipossomas: Vectores atrativos e versáteis para o direcionamento de (bio)fármacos. **Revista da Faculdade de Ciências da Saúde**, v. 7, p. 168-178, 2010.

DRÍGELOVÁ, M.; TARABOVÁ, B.; DUBURS, G.; LACINOVÁ, L. The dihydropyridine analogue cerebrocrast blocks both T-type and L-type calcium currents. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 87, n. 11, p. 923-932, 2009.

DURANT, C.; CHRISTMAS, D.; NUTT, D. The Pharmacology of Anxiety. **Current Topics in Behavioral Neurosciences**, v. 2, p. 303-330, 2010.

FAUSTINO, T. T.; ALMEIDA, R. B. A.; ANDREATINI, R. Plantas medicinais no tratamento do transtorno de ansiedade generalizada: uma revisão dos estudos clínicos controlados. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 32, n. 4, p. 429-436, 2010.

GALLAGHER, P. S.; MCKERNAN, M. G.; XIE, J.; ZINEBI, F. L-Type Voltage-Gated Calcium Channels Are Involved in the in Vivo and in Vitro Expression of Fear Conditioning. **Annals of The New York Academy of Sciences**, v. 985, n. 1, p. 135-149, 2006.

GHASSAN, W.; PATRICK, R.; KEARNEY, S. A.; FAY, R.; BRACARD, S.; FELBLINGER, J.; BOIVIN, J. M.; LACOLLEY, P.; ZANNAD, F.; BENETOS, A. Use of calcium channel blockers is associated with better cognitive performance in older hypertensive patients with subjective memory complaints. **Journal of Hypertension**, v. 28, n. 12, p. 2485-2493, 2010.

GONÇALVES, D. M., KAPCZINSKI, F. Prevalência de transtornos mentais em indivíduos de uma unidade de referência para Programa Saúde da Família em Santa Cruz do Sul, Rio Grande do Sul, Brasil. **Caderno de Saúde Pública**, v. 24, n. 9, p. 2043-2053, 2008.

HAILE, M. M. D.; LIMSON, F. B. A.; GINGRICH, K. M. D.; LI, Y. S. M. D.; QUARTERMAIN, D.; BLANCK, T. M. D.; BEKKER, A. M. D. Nimodipine Prevents Transient Cognitive Dysfunction After Moderate Hypoxia in Adult Mice. **Journal of Neurosurgical Anesthesiology**, v. 21, n. 2, p. 140-144, 2009.

HOVATTA, I.; JUHILA, J.; DONNER, J. Oxidative stress in anxiety and comorbid disorders. **Neuroscience Research**, v. 68, p. 261-275, 2010.

KOHLMANN, O.; GUS, M.; RIBEIRO, A. B.; VIANNA, D.; COELHO, E. B.; BARBOSA, E.; ALMEIDA, F. A.; FEITOSA, G.; MORENO, H.; GUIMARÃES, J. I.; RIBEIRO, J. P.; RAMIREZ, J. A. F.; MARTINS, J. F. V.; SANTOS, R. A. S. Tratamento Medicamentoso. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, v. 32, n. 1, p. 29-43, 2010.

KUMAR, K. P. S.; BHOWMIK, D.; DEB, L. Recent trends in liposomes used as novel drug delivery system. **The Pharma Innovation**, v. 1, n. 1, 2012.

KUO, I. Y.; ELLIS, A.; SEYMOUR, V. A.; SANDOW, S. L.; HILL, C. Dihydropyridine-insensitive calcium currents contribute to function of small cerebral arteries. **Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism**, v. 30, p. 1226-1239, 2010.

LIU, C.; YANG, S.; LIU, W.; WANG, R.; WAN, J.; LIU, W. Preparation and characterization of medium-chain fatty acid liposomes by lyophilization. **Journal of Liposome Research**, v. 20, n. 3, p. 183-190, 2010.

LONGO, M. A. T.; MARTELLI, A.; ZIMMERMANN, A. Hipertensão arterial sistêmica: aspectos clínicos e análise farmacológica no tratamento dos pacientes de um setor de psicogeriatría do Instituto Bairral de Psiquiatria, no município de Itapira, SP. **Revista Brasileira de geriatría e gerontologia**, v. 14, n. 2, p. 271-284, 2011.

MA, D. K.; RINGSTAD, N. The neurobiology of sensing respiratory gases for the control of animal behavior. **Frontiers in Biology**, v. 7, n. 3, p. 246-253, 2012.

MACHADO, R. A.; ROMERO, E. B.; ASTENCIO, A. M. G.; SANTOS, A. S.; CUARTAS, V. B.; LÓPEZ, M. M. Prospective Randomized Controlled Trial of Nimodipine as Add-On Therapy in the Treatment of Focal Refractory Epilepsy Patients: A Pilot Study. **Journal of Neurology & Neurophysiology**, v.4, n. 151, 2013.

MAGALHÃES, N.S.S; MOSQUEIRA, V. C. F. Nanotechnology applied to the treatment of malaria. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 62, n. 4, p. 560-575, 2010.

MARINO, V.; PISANTI, N.; CAPONE, D. Effects of nimodipine on psychological-stress situation in aged rats. **Acta Neurologica**, v. 5, n. 5, p.410-417, 1991.

MEDEI, E.; RAIMUNDO, J. M.; NASCIMENTO, J. H. M.; TRACHEZ, M. M.; SUDO, R. T.; SUDO, G. Z. Inibição da corrente de cálcio tipo L por tramadol e enantiômeros em miócitos cardíacos de ratos. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 97, n. 4, p. 324-330, 2011.

MULUMO, S.C.C.; MENEZES, G.B.; VIGNE, P.; FONTENELLE, L.F. A review on predictors of treatment outcome in social anxiety disorder. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 34, n. 1, p. 92-100, 2012.

NIKOLAUS, S.; ANTKE, C.; BEU, M.; MÜLLER, H. W. Cortical GABA, striatal dopamine and midbrain serotonin as the key players in compulsive and anxiety disorders-results from in vivo imaging studies. **Reviews in The Neurosciences**, v. 21, n. 2, p. 119-140, 2011.

PIMENTEL, L. F.; JÁCOME JÚNIOR, A. T.; MOSQUEIRA, V. C. F.; SANTOS-MAGALHÃES, N. S. Nanotecnologia farmacêutica aplicada ao tratamento da malária. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 43, n. 4, p. 503-514, 2007.

RECKZIEGEL, P.; BOUFLEUR, N.; BARCELOS, R.C.S.; BENVEGNÚ, D.M.; PASE, C.S.; MULLER, L.G.; TEIXEIRA, A.M.; ZANELLA, R.; PRADO, A.C.P.; FETT, R.; BLOCK, J.M.; BURGER, M.E. Oxidative stress and anxiety-like symptoms related to withdrawal of passive cigarette smoke in mice: Beneficial effects of pecan nut shells extract, a by-product of the nut industry. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 74, p. 1770-1778, 2011.

RIBEIRO, C.A.S. **Bateria sequencial de procedimentos para avaliação da atividade ansiolítica e antidepressiva em camundongo**. 2010. 58 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2010.

RODRIGUES, S.A. **Efeito ansiolítico do extrato etanólico de *Pluchea sagittalis* (Lam.) Cabrera, Asteraceae, em modelos comportamentais**. 2011. 105 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO), São Cristovão, Sergipe.

ROSA, M. R.D.; PIMENTA, F. A.; LIMA, A. A. F.; DINIZ, M. A. R.; SILVA, M. F. F. M.; GONÇALVES, C. Zumbido e ansiedade: uma revisão da literatura. **Revista CEFAC**, v. 14, n. 4, p. 742-754, 2012.

SARDINHA, A.;FREIRE, R. C.; ZIN, W. A.;NARDI, A. E. Respiratory manifestations of panic disorder: causes, consequences and therapeutic implications. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 35, n. 7, p. 698-708, 2009.

SAAVEDRA, J. M.;LEMUS, E.S.; BENICKY, J. Blockade of brain angiotensin II AT1 receptors ameliorates stress, anxiety, brain inflammation and ischemia: Therapeutic implications. **Psychoneuroendocrinology**, v. 36, n. 1, p. 1-18, 2011.

SUN, C.; WANG, J.; LIU, J.; QIU, L.; ZHANG, W.; ZHANG, L. Liquid Proliposomes of Nimodipine Drug Delivery System: Preparation, Characterization, and Pharmacokinetics. **AAPS PharmSciTech**, v. 14, n. 1, p. 332-338, 2013.

UEMAETOMARI, I.; TABUCHI, K.; NAKAMAGOE, M.; TANAKA, S.; MURASHITA, H.; HARA, A. L-type voltage-gated calcium channel is involved in the pathogenesis of acoustic injury in the cochlea. **The Tohoku Journal of Experimental Medicine**, v. 218, n. 1, p. 41-47, 2009.

WANG, Z.; DENG, Y.; ZHANG, X.; WANG, T.; WU, F. Development and pharmacokinetics of nimodipine-loaded liposomes. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 58, n. 9, p. 1289-1294, 2006.

WANKERL, K.; WEISE, D.; GENTNER, R.; RUMPF, J. J.; CLASSEN, J. L-Type Voltage-Gated Ca²⁺ Channels: A Single Molecular Switch for Long-Term Potentiation/Long-Term Depression-Like Plasticity and Activity-Dependent Metaplasticity in Humans. **The Journal of Neuroscience**, v. 30, n. 18, p. 6197-6204, 2010.

XIANG, J.; ZHANG, L.; WANG, X.; SUN, X.; WANG, J.; QI, X. Preparation and transdermal diffusion in vitro of nimodipine liposomes. **China Pharmacy**, v. 20, p. 36-38, 2009.

CAPÍTULO I: Os principais avanços científicos das formulações farmacêuticas lipossomais com efeitos neuroprotetores e antioxidantes

Os principais avanços científicos das preparações farmacêuticas lipossomais com efeitos neuroprotetores e antioxidantes

OLIVEIRA, G.Z.S.¹; ALMEIDA, V.P.A.²; OLIVEIRA, J.S.²; MORENO, L.C.G.A.I.³;
MAGALHÃES, N. S. S.³; FREITAS, R.M.¹; ROLIM, H.M.L.¹

¹Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Piauí, Teresina, Piauí, Brasil.

²Curso de Farmácia da Universidade Federal do Piauí, Teresina, Brasil.

³Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil.

RESUMO

O objetivo dessa revisão integrativa foi realizar um levantamento sobre os artigos publicados nos últimos dez anos que abordaram os benefícios científicos proporcionados por preparações lipossomais com efeitos neuroprotetores e/ou antioxidantes. Para tanto, foi feita uma busca de artigos que descreveram encapsulações de compostos de origem de natural e sintética com potencial neuroprotetor e/ou antioxidante em modelos *in vivo* ou *in vitro*, utilizando as bases de dados eletrônicas Science Direct, BVS (Biblioteca Virtual em Saúde), PubMed e Scielo. Inicialmente foram utilizadas as palavras de busca *liposomes* and *antioxidants* and *neuroprotective agents* e posteriormente para encontrar resultados que relacionassem de forma mais específica os potenciais neuroprotetores e/ou antioxidantes das formulações com as consequências de sua administração para fortalecimento das defesas antioxidantes endógenas enzimáticas, foram adicionados à revisão os artigos encontrados com as seguintes palavras de busca *liposomes* and (*antioxidants* or *neuroprotective agents*) and *glutathione* and *catalase*. Como resultados, foram encontrados 1.734 artigos, desses 13 foram selecionados, tendo a pesquisa como critérios de exclusão os artigos que não apresentavam indicativos, no título ou no resumo, da promoção de efeito neuroprotetor e/ou antioxidante proporcionado por lipossomas, artigos publicados há mais de 10 anos, os repetidos em mais de uma base, além dos que não foram obtidos na íntegra, os que se encontravam na forma não gratuitas e os publicados em línguas diferentes da portuguesa, inglesa e espanhola. Os resultados desse estudo indicaram que os artigos sobre essa temática estão em constante crescimento, tendo especial destaque a partir de 2008, ano de maior quantidade de publicações, desse ano até a atualidade se concentram 61,5% dos artigos publicados. Nesses artigos também foi contatada a marcante presença dos compostos isolados de plantas medicinais encapsuladas,

representando 61,5% das substâncias utilizadas, muitos desses artigos têm em comum o emprego da quercetina, o flavonóide mais citado, embora sejam notadas diferenças quanto a sua aplicação terapêutica. Além disso, pode ser percebido que os lipossomas convencionais foram os mais utilizados, embora tenham registros também de lipossomas peguizados e sítio-específicos dentre os artigos selecionados. Estes lipossomas agiram em diversas patologias como carcinoma hepatocelular, encefalomielite autoimune, ansiedade e doenças neurodegenerativas como Doença de Parkinson e Doença de Alzheimer. Além de promoverem o melhoramento do funcionamento hepático, a reversão da lesão pulmonar, a neuroproteção contra as lesões produzidas pelo álcool e pelos danos cerebrais isquêmicos. Sugerindo que a aplicação da nanotecnologia na indústria farmacêutica é uma boa alternativa para produção de novos medicamentos neuroprotetores e antioxidantes que podem atuar no tratamento e prevenção de diversas patologias, embora sejam necessários mais experimentos para certificar a segurança da utilização dos constituintes desse sistema de vetorização, bem como um maior detalhamento dos riscos e efeitos adversos dessa escolha terapêutica.

PALAVRAS-CHAVE: Antioxidantes; Lipossomas; Neuroprotetores; Preparações Farmacêuticas.

Abstract: The major scientific advances of liposomal pharmaceutical preparations with effects neuroprotectives and antioxidants

The purpose of this integrative review was to conduct a survey of articles published in the last ten years that addressed the scientific benefits provided by liposomal preparations with effects neuroprotectives and/or antioxidants. Therefore, a search was made for articles that described encapsulations compounds of natural and synthetic origin with potential neuroprotective and/or antioxidant *in vivo* or *in vitro* models, using electronic data bases Science Direct, BVS (Virtual Health Library), PubMed and SciELO. Initially used the search words *liposomes* and *antioxidants* and *neuroprotective agents* and subsequently to find results that related more specifically the potential neuroprotective and/or antioxidant formulations with the consequences of his administration to strengthen the endogenous enzymatic antioxidant defenses were added in review the items found with the following search words *liposomes* (*antioxidants* or *neuroprotective agents*) and *glutathione* and *catalase*. As a result, 1.734 articles were found, 13 of these were selected, and the research as exclusion criteria items that did not meet the objectives proposed by this review, as well as those who did not present indicative in the title or abstract, the promotion effect neuroprotective and/or antioxidant provided by liposomes articles published more than 10 years, repeated in more than one base beyond that have not been fully obtained and which were not in free form. The results of this

study indicated that articles on this topic are constantly growing, with particular emphasis from 2008, the year of highest number of publications, this year until today concentrate 61,5% of the articles published. These articles was also contacted the striking presence of the compounds isolated from medicinal plants encapsulated, representing 61,5% of the substances used, many of these articles have in common the use of quercetin, the flavonoid most cited, although noticeable differences in their therapeutic application . Moreover, it can be seen that the conventional liposomes were the most used, although records also peguilados liposomes and site-específicos among the selected articles. These liposomes have acted in a number of pathologies such as hepatocellular carcinoma, autoimmune encephalomyelitis, anxiety, and neurodegenerative diseases such as Parkinson's disease and Alzheimer's disease. In addition to promoting the improvement of liver function, reversal of lung injury, neuroprotection against injury produced by alcohol and by ischemic brain damage. Suggesting that the application of nanotechnology in the pharmaceutical industry is a good alternative for the production of new drugs and neuroprotective antioxidants that can act in the treatment and prevention of various diseases, although more experiments are needed to ensure the safe use of the constituents of this system vectorization, as well as further details of the risks and adverse effects of this treatment choice.

KEYWORDS: Antioxidants; Liposomes; Neuroprotective; Pharmaceutical Preparations.

1INTRODUÇÃO

Os lipossomas são vesículas lipídicas esféricas que podem ter em sua composição fosfolipídios naturais e colesterol, além de se apresentarem com diversos tamanhos que podem variar de 50 nm até vários micrômetros de diâmetros. Eles foram descobertos em 1961 por Alec Bagham que realizava experimentos de coagulação sanguínea, quando observou que ao misturar fosfolipídios com água havia formação de vesículas lipídicas (KUMAR; BHOWMIK; DEB, 2012).

Seu processo de formação acontece em virtude da natureza anfótera dos fosfolipídios que ao entrar em contato com soluções aquosas, formam vesículas lipídicas esféricas, com a parte hidrofílica voltada para o interior, na qual ficam armazenados os fármacos hidrossolúveis, e a hidrofóbica para o exterior, região na qual os fármacos lipofílicos ficam imersos entre a membrana lipídica. A natureza lipídica dos lipossomas favorece a liberação controlada dos fármacos, uma vez que estes podem se fundir com outras bicamadas lipídicas como as celulares. Esse nanossistema apresenta como vantagem também o melhoramento da farmacocinética e a melhor biodistribuição de substâncias como fármacos, proteínas recombinantes, vacinas e oligonucleotídeos. Além de serem os pioneiros na utilização da

prática clínica, sendo até a atualidade os únicos autorizados para administração endovenosa (OLIVEIRA et al., 2012).

Como é o caso do Doxil, a primeira formulação farmacêutica lipossomal comercializada, tendo como princípio ativo a doxorubicina, direcionada para o tratamento do Sarcoma de Kaposi associado à Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS)(BARENHOLZ, 2012). Da mesma forma, estudos estão sendo realizados para demonstrar o potencial antioxidante e neuroprotetor de formulações lipossomais, seja na encapsulação de substâncias de origem natural ou sintética (KIZELSZTEIN et al., 2009; WANG et al., 2011).

Por definição, são consideradas antioxidantes todas as substâncias envolvidas na inibição de um processo oxidativo, sua participação auxilia na conservação do equilíbrio oxidativo no organismo, inibindo a ocorrência de danos celulares (HALLIWELL, 2011). Sendo, portanto, percebido forte envolvimento dos agentes oxidantes ou radicais livres, como espécies reativas derivadas de oxigênio e nitrogênio, em várias patologias, inclusive as neurológicas (FREITAS et al., 2010; FERREIRA; ALMEIDA; FREITAS, 2012).

A partir disso, a presente revisão teve como objetivo analisar a produção científica de artigos que abordaram a temática das preparações lipossomais com potencial neuroprotetore/ou antioxidante publicada nos dez últimos anos, adotando os seguintes critérios de análise: verificar a origem das substâncias (natural ou sintética) que estão sendo alvos principais de nanocarreadores lipossomais, bem como quantificar os artigos de acordo com os anos de suas publicações, os tipos de lipossomas utilizados e as principais doenças abordadas nesses artigos.

2MATERIAL E MÉTODOS

A realização dessa revisão bibliográfica foi possível por meio da busca de artigos originais e obtidos na íntegra. Inicialmente foi feita uma consulta por índice, na forma permutada, no banco de DeCS (Descritores em Ciências da Saúde) da Biblioteca Virtual em Saúde (BVS), isso permitiu a seleção das palavras de busca. Em seguida, foram analisados os artigos nas bases de dados eletrônicas Science Direct, BVS, PubMed e Scielo. Utilizando como critério de busca ou inclusão inicial a seleção de artigos que apresentassem alguma correlação, no título ou no resumo, com os objetivos propostos pela revisão. Foram considerados os artigos publicados na língua inglesa, portuguesa e espanhola que foram publicados nos últimos dez anos (Janeiro de 2003 a Julho de 2013). Os critérios para exclusão foram: artigos que não possuíam no conteúdo do título ou do resumo, resultados que relatassem o potencial neuroprotetor e/ou antioxidante dos lipossomas, além dos artigos

publicados em idiomas diferentes dos anteriormente citados, os artigos publicados a mais de dez anos, ou repetidos em mais de uma base, além dos que não foram obtidos na íntegra ou que eram de revisão de literatura e de origem não experimental, bem como dissertações, teses, resumo em anais, sites de notícias, livros e capítulos.

A coleta de artigos começou no Science Direct, depois prosseguiu para BVS, logo em seguida foi continuada no PubMed e no Scielo, utilizando as palavras de busca *liposomes* and *antioxidants* and *neuroprotective agents*. Posteriormente, houve necessidade de ampliar as palavras de busca para encontrar resultados que relacionassem de forma mais específica os potenciais antioxidantes e/ou neuroprotetores das preparações lipossomais com o fortalecimento das defesas antioxidantes endógenas enzimáticas, de forma que foram adicionados também a revisão os artigos encontrados com as palavras de busca *liposomes* and (*antioxidants* or *neuroprotective agents*) and *glutathione* and *catalase*, utilizando os mesmos critérios de inclusão e exclusão das palavras de busca anteriores.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Ao fim da busca bibliográfica foram encontrados 1.734 artigos nas bases de dados analisadas, todos na língua inglesa, porém apenas 13 atenderam os objetivos e os critérios de inclusão adotados por essa revisão integrativa (**Tabela 1**). Os artigos selecionados foram divididos por tópicos para discussão, de acordo com seu efeito farmacológico e a natureza da substância encapsulada.

Tabela 1. Artigos encontrados e selecionados de acordo com as bases eletrônicas e as palavras-chave utilizadas.

Bases de dados Palavras de busca	Science Direct	BVS	PubMed	Scielo	Total
<i>Liposomes</i> and <i>Antioxidants</i> and <i>Neuroprotective</i> <i>Agents</i>	452 selecionados	8 4 selecionados	67 5 selecionados (4 repetidos)	0	9
<i>Liposomes</i> and (<i>Antioxidants</i> or <i>Neuroprotective</i> <i>Agents</i>) and <i>Glutathione</i> and <i>Catalase</i>	1.160 3 selecionados (2 repetidos)	14 2 selecionados (1 repetido)	33 4 selecionados (2 repetidos)	0	4

Dos treze artigos selecionados, oito apresentavam lipossomas provenientes de substâncias de origens naturais e cinco de origens sintéticas. Foi possível constatar que as principais patologias destacadas nesses artigos foram carcinoma hepatocelular, encefalomielite autoimune, ansiedade e doenças neurodegenerativas como Doença de Parkinson e Doença de Alzheimer. Nesse mesmo sentido, foi possível observar também o melhoramento do funcionamento hepático, a reversão da lesão pulmonar, a neuroproteção contra as lesões produzidas pelo álcool e pelos danos cerebrais isquêmicos.

De acordo com sua capacidade de interação com o meio biológico os lipossomas podem ser divididos como convencionais, peguilados e sítio-específicos. Nessa revisão de literatura foram encontrados oito artigos que relataram a presença de lipossomas convencionais, três artigos de lipossomas peguilados e dois artigos de lipossomas sítio-específicos: um de lipossoma manossilados e o outro de galactossilados.

Foi percebido também que os relatos de estudos sobre essa temática representam uma crescente, com especial destaque a partir de 2008, ano de maior quantidade de publicações, desse ano até a atualidade se concentram 61,5% dos artigos publicados. Fazendo uma segmentação de acordo com os anos de publicações dos escritos, foi encontrado um artigo no ano de 2004, um artigo no ano de 2005, dois artigos no ano de 2006, um artigo no ano de 2007, três artigos em 2008, um artigo em 2009, dois artigos em 2010 e dois em 2011. Todos os dados podem ser visto na **Tabela 2** que apresenta uma caracterização dos artigos selecionados de acordo com os respectivos autores, objetivos, conclusões, anos de publicação e substâncias encapsuladas.

Atualmente, há uma forte tendência em utilizar a nanotecnologia como um sistema de entrega de fármacos para tratamento de doenças neurodegenerativas, especialmente Doença de Alzheimer e de Parkinson, pelo fato dessa ciência contribuir com o desenvolvimento de nanopartículas com elevada especificidade pelas células endoteliais capilares do cérebro, o que melhora a interação dos medicamentos com os respectivos sítios alvos, de modo a elevar os efeito farmacológico e diminuir os efeitos adversos (MODI et al., 2009; SAHNI et al., 2011). Essas nanopartículas podem inclusive bloquear ou reverter os processos neuropatológicos, por propiciar a penetração da droga no sistema nervoso central (SNC) e ainda manter os níveis dos medicamentos constantes na circulação por dias, semanas ou meses, sendo uma opção terapêutica para promoção da neuroproteção contra o estresse oxidativo (NUNES; JAMAL; KOSTARELOS, 2012), diagnóstico de Doença de Alzheimer (BRAMBILLA et al., 2011), nanoreparo de nervos e nanoneuromodulação (KHAWAJA, 2011).

3.1 AÇÃO ANTIOXIDANTE DE LIPOSSOMAS CONTENDO SUBSTÂNCIAS DE ORIGEM NATURAL

Substâncias naturais estão sendo cada vez mais alvos de encapsulamento em modelos lipossomais para avaliação e/ou melhoramento da sua capacidade antioxidante. Exemplificam essa tendência o desenvolvimento de lipossomas de extratos ou substâncias isoladas de plantas medicinais. Nesse estudo foram encontrados cinco artigos que relataram o potencial antioxidante de preparações lipossomais de substâncias de origem natural, com especial destaque para a classe dos flavonóides que lideraram a composição desses sistemas, com 80% de participação nos experimentos dos artigos encontrados.

Como é o caso dos lipossomas sítio-específicos de quercetina, um composto polifenólico de plantas medicinais, que demonstrou efeito antioxidante em dois artigos encontrados, porém sua ação propiciou melhora terapêutica em diferentes patologias. Segundo Sarkar e colaboradores (2006) os lipossomas manossilados de quercetina apresentaram certa seletividade cerebral, com melhores efeitos antioxidantes em ratos jovens do que em ratos idosos. Fato comprovado pelas dosagens cerebrais de superóxido dismutase, catalase, glicose-6-fosfato desidrogenase, glutatona redutase e glutatona S-transferase que se mostraram mais elevadas em ratos jovens após o procedimento de isquemia/reperfusão (I/R) da artéria carótida. De modo geral, essa formulação preveniu a diminuição das enzimas antioxidantes, auxiliando a manutenção das defesas antioxidantes endógenas, bem como impediu acentuadamente a formação de edema em células neuronais de ratos jovens e velhos.

No entanto, de acordo com Mandal e colaboradores (2008) os benéficos no metabolismo hepático foram evidenciados, com planejamento de lipossomas galactosilados de quercetina para atuar especificamente no fígado de ratos com hepatocarcinoma induzido por dietilnitrosamina. A aplicação intravenosa dos lipossomas, uma vez por semana, durante 16 semanas impediu o desenvolvimento de hepatocarcinoma e de lesões oxidativas hepáticas induzidas por esse composto, além de aperfeiçoar o uso clínico da quercetina, uma vez que essa não apresenta solubilidade em água, melhorando a farmacocinética desse flavonóide, o que revela a importância da utilização desses lipossomas na intervenção terapêutica do hepatocarcinoma induzido por dietilnitrosamina.

Também no fígado, outro flavonóide encapsulado que desempenhou importante ação antioxidante foram os lipossomas convencionais de licopenos (L-LYC). Eles foram responsáveis por aumentar a atividade antioxidante no soro e no fígado do grupo de ratos que receberam L-LYC. Além disso, foi evidenciado que os lipossomas aumentaram o tempo de absorção do licopeno, elevaram seu potencial antioxidante e diminuíram a peroxidação lipídica, quando comparado com o grupo que recebeu licopeno livre (TIAN et al., 2007).

Outra formulação flavonoidal que se destacou por apresentar potencial terapêutico contra os efeitos produzidos pela isquemia foram os lipossomas convencionais contendo luteolina (lipLU), utilizando o modelo I/R pela técnica de oclusão da artéria cerebral média. A luteolina foi isolada do fruto maduro de *Perilla frutescens* (L.) Britt, e as aplicações de seus lipossomas depois do procedimento de I/R foram eficientes para prevenir as alterações comportamentais e histológicas, além de diminuir os índices de espécies reativas derivadas de oxigênio, após 13 dias de tratamento. Desse modo, esse estudo aponta que os lipossomas contendo luteolina podem apresentar considerado efeito neuroprotetor como potencial para tratar isquemias, por reestabelecer o balanceamento do estado pró-oxidante e antioxidante (ZHAO et al., 2011).

Com isso, é possível atestar que em modelos *in vivo* as formulações lipossomais derivadas de flavonóides, descritas até o momento, demonstraram significativos potenciais antioxidantes no cérebro e no fígado. No entanto, foi encontrado um artigo que atestou o efeito antioxidante *in vitro* de uma formulação contendo um beta carotenóide.

É o caso da astaxantina, um pigmento carotenóide com extraordinária atividade antioxidante, que foi encapsulado em lipossomas convencionais na tentativa de melhorar a biodisponibilidade dessa substância nas linhagens celulares Hep3B e HepG2 (Carcinoma Hepatocelular). Os lipossomas demonstraram estabilidade, boa habilidade de transporte e melhor ativação de enzimas antioxidantes como superóxido dismutase, catalase e glutathione S-transferase, quando comparados com a Astaxantina livre. Quando associado com emissão de radiação gama, pode ser percebida também uma potencialização na captura dos lipossomas pelas células Hep3B e HepG2, o que sugere uma possível utilização de lipossoma contendo astaxantina como adjuvante na terapia com o uso da radiação gama (PENG et al., 2010).

Além dos lipossomas de origem natural, as formulações contendo substâncias sintetizadas podem expressar importante efeito antioxidante, conforme descrito na próxima sessão.

3.2 AÇÃO ANTIOXIDANTE DE LIPOSSOMAS CONTENDO SUBSTÂNCIAS DE ORIGEM SINTÉTICA

Foram encontrados três artigos que relataram o potencial antioxidante de lipossomas contendo substâncias sintéticas, como é o caso do encapsulamento de Cu/Zn superóxido-dismutase, tempamina, catalase e superóxido dismutase.

Embora os artigos descritos anteriormente relatassem as vantagens do efeito antioxidante dos lipossomas nas doenças cerebrais e hepáticas, foi constatado também em dois artigos que lipossomas antioxidantes podem atuar no tratamento de lesões pulmonares.

Dessa forma, Rengel e colaboradores (2005) evidenciaram que o pré-tratamento de células epiteliais do pulmão humano (A2182) com lipossomas convencionais contendo CuZnSOD (Cu/Zn superóxido-dismutase) se mostrou eficiente para proteger essas células contra o estresse oxidativo. Nesse artigo foram analisados lipossomas com carga negativa (aniônicos), com carga positiva (catiônicos) e com carga neutra, todas contendo CuZnSOD, esses foram responsáveis por aumentar a concentração celular de SOD em 108%, 85% e 83%, respectivamente.

Já McClintocke colaboradores (2006) verificaram o efeito terapêutico dos lipossomas em lesões pulmonares, ao observar que a instilação de sulfeto de 2-cloroetil etilo em combinação consecutiva com a aplicação de lipossomas peguilados de catalase e superóxido dismutase promoveu significativa atenuação do desenvolvimento da lesão pulmonar. Do mesmo modo, a co-instilação de lipossomas de agentes redutores, N-acetilcisteína, glutatona ou resveratrol promoveu uma redução significativa da lesão pulmonar aguda.

Outro estudo, com diferente abordagem, demonstrou também que lipossomas peguilados de tempamina são capazes de promover a liberação lenta e controlada desse composto, além de alcançar a circulação cerebral de ratos proporcionando significativos efeitos terapêuticos para o tratamento de encefalomielite autoimune experimental. Esses resultados podem ser atribuídos ao potencial antioxidante da tempamina, um tipo de nitróxido de piperidina estável, com capacidade de reverter o dano oxidativo proveniente de espécies reativas derivadas com oxigênio, elementos muito comuns em doenças neurodegenerativas relacionadas ao estresse oxidativo. Foi possível averiguar também que os lipossomas peguilados, além de apresentarem maior habilidade de alcançar o cérebro, demonstraram maior efeito farmacológico que a substância livre (KIZELSZTEIN et al., 2009).

3.3 AÇÃO NEUROPROTETORA DE LIPOSSOMAS CONTENDO SUBSTÂNCIAS DE ORIGEM NATURAL

Corroborando com os resultados expostos no tópico 3.1 foi visto aqui que as substâncias naturais encapsuladas desempenham importante influência sobre o tratamento de patologias que acometem o SNC, com todos os artigos reportando os efeitos neuroprotetores de lipossomas flavonoidal.

É o caso da encapsulação lipossomal de quercetina, um flavonóide de ação antioxidante, que quando encapsulada em lipossomas convencionais promove o favorecimento da atividade ansiolítica e cognitiva em ratos, de modo que sua administração intranasal produziu melhores resultados, sendo, assim, a melhor via de administração para entrega de quercetina no sistema nervoso central (PRIPREM et al., 2008).

Foi visto também que lipossomas contendo quercetina tiveram representativa ação protetora contra os efeitos cerebrais causados pela isquemia. A administração prévia de lipossomas de quercetina em ratos que tiveram indução de isquemia focal permanente (por oclusão da artéria cerebral média) reduziu os danos cerebrais isquêmicos, proporcionou parcial inversão dos déficits motores, além de aumentar significativamente a reserva de glutathione reduzida e a quantidade de células no corpo estriado e no córtex. Fato que não aconteceu com a quercetina livre, por essa não conseguir alcançar a circulação cerebral. A neuroproteção oportunizada por essa preparação lipossomal minimizou os efeitos do estresse oxidativo que são de importância fundamental na patogênese da lesão por isquemia cerebral. Sugerindo que esse lipossoma constitui um importante mecanismo de defesa após isquemia (RIVERA et al., 2008).

Outro flavonóide encapsulado que também demonstrou importante efeito neuroprotetor foi o resveratrol, derivado de *Rhizoma Et Radix Polygoni Cuspidati*, que após 14 dias de aplicações de sua forma livre e sua forma lipossomal convencional em ratos com Doença de Parkinson foi responsável por diminuir o comportamento de rotação anormal dos animais, bem como reduzir a perda e a apoptose de células nigrais, além de proporcionar a redução do nível de espécies reativas derivadas de oxigênio, promovendo efeito antioxidante e protetor dos neurônios dopaminérgicos em ratos com Doença de Parkinson, auxiliando no tratamento do portador de Doença de Parkinson, uma vez que o estresse oxidativo influencia na patogênese dessa doença, por culminar na perda seletiva de neurônios dopaminérgicos nigrais. Porém foi possível perceber que o resveratrol lipossomal apresentou melhores efeitos do que o livre, devido ao aumento de sua biodisponibilidade (WANG et al., 2011).

Todas essas informações destacam mais uma vez a importância da utilização de lipossomas como carreadores de substâncias potencialmente úteis para o tratamento de patologias que acometem o sistema nervoso central e estão relacionadas com o estresse oxidativo, esta mesma relação pode ser vista no tópico seguinte.

3.4 AÇÃO NEUROPROTETORA DE LIPOSSOMAS CONTENDO SUBSTÂNCIAS DE ORIGEM SINTÉTICA

O menor número de experimentos encontrados foram os que relacionavam o efeito neuroprotetor de substâncias de origem sintética encapsuladas, com somente dois artigos. Corroborando com a quantidade ínfima de artigos expostos no segundo tópico (3.2) referente à atividade antioxidante de substâncias de origem sintética.

Ambos os artigos reportaram a capacidade neuroprotetora dos lipossomas em experimentos *in vitro*, porém com direcionamentos diferentes. No entanto, em um deles foram

realizados experimentos com lipossomas peguilados contendo um medicamento, enquanto no outro foram feitos testes com lipossomas convencionais contendo uma enzima antioxidante. Os dois experimentos também divergiram quanto ao local de ação, com um deles agindo nos astrócitos corticais primários dos ratos, enquanto o outro atuou sobre neurônios mesencefálicos.

Dessa forma, Paulino e colaboradores (2004) verificou que o encapsulamento de idebenona em lipossomas peguilados revelou ser mais eficaz que a idebenona livre para neutralizar o dano induzido por etanol em astrócitos corticais primários de rato (*in vitro*). Sendo necessária uma dose de lipossoma dez vezes menor que o fármaco livre para proporcionar esse efeito, essa vantagem está associada ao fato dessa formulação aumentar a biodisponibilidade do medicamento nessas células.

Já Zeevalk e colaboradores (2010) atestou que os lipossomas convencionais contendo glutathione reduzida liberam essa enzima de forma controlada, o que favorece a reposição e a manutenção de glutathione intracelular. Evidência muito importante, visto que em muitas doenças neurodegenerativas há alterações nas defesas antioxidantes com diminuição de glutathione, é o caso da Doença de Parkinson em que há redução de aproximadamente 40 a 50% da glutathione total. Após quatro horas da aplicação, os lipossomas restauraram os níveis intracelulares dessa enzima apresentando cem vezes maior potência. Além de proporcionar de forma segura neuroproteção para neurônios mesencefálicos, ação comprovada por experimentos em modelo *in vitro* de Doença de Parkinson.

Tabela 2: Caracterização dos artigos selecionados de acordo com os respectivos autores, objetivos, conclusões, anos de publicação e substâncias encapsuladas.

Autores	Objetivos	Conclusão	Ano	Substância encapsulada
Paolino, D.; Iannone, M.; Cardile, V.; Renis, M.; Puglisi, G.; Rotiroti, D.; Fresta, M.	Avaliar a tolerabilidade e a ação protetora de lipossomas peguizados contendo idebenona em lesões corticais primárias induzidas por etanol.	Os lipossomas de idebenona revelaram maior eficiência que a idebenona livre para neutralizar o dano induzido por etanol em astrócitos corticais primários de rato, com uma dose de lipossoma dez vezes menor que o fármaco livre.	2004	Idebenona
Rengel, R.G.; Grčić, J.F.; Čepelak, I.; Grubišić, T.Z.; Barišić, K.	Examinar a eficiência de entrega e o potencial antioxidante de lipossomas contendo Cu/Zn superóxido dismutase, com diferentes cargas em células epiteliais pulmonares (A2182).	Os três tipos de lipossomas de Cu/Zn superóxido dismutase alcançaram as células epiteliais pulmonares (A2182), aumentando consideravelmente a concentração celular de SOD, protegendo essas células do estresse oxidativo	2005	Cu/Zn superóxido dismutase
Sarkar, S.; Das, N.	Avaliar o potencial antioxidante de lipossomas contendo quercetina em modelo de isquemiae reperfusão cerebral utilizando ratos jovens e idosos, bem como verificar a capacidade desse nanossistema entregar quercetina no cérebro.	O tratamento proporcionou a entrega da quercetina no cérebro, além de preservar a atividade das enzimas antioxidantes e inibir a formação de edema nas células neuronais de ratos jovens e velhos	2006	Quercetina

<p>McClintock, S. D.; Hoese, L. M.; Das, S. K, Till, G. O.; Neff, T.; Kunkel, R. G.; Smith, M. G., Ward, P. A.</p>	<p>Avaliar a atenuação da lesão pulmonar aguda, induzida por instilação de sulfeto de 2-cloroetil etilo (CEES), proporcionada por lipossomas peguilados de catalase e superóxido dismutase.</p>	<p>A instilação de CEES em combinação consecutiva com a aplicação de lipossomas peguilados de catalase e superóxido dismutase promoveu significativa atenuação do desenvolvimento da lesão pulmonar aguda</p>	<p>2006</p>	<p>Catalase e Superóxido dismutase</p>
<p>Tian, Y.Y.; Ge, L.; Duan, X.L.; GAO, Z.G; Chang, Y.Z.</p>	<p>Avaliar a libertação <i>in vitro</i> de licopeno encapsulado em lipossomas e seu potencial antioxidante em modelo animal.</p>	<p>Os lipossomas de licopeno prolongaram o tempo de absorção dessa substância no plasma, bem aumentaram o efeito antioxidante e reduziram a peroxidação lipídica em comparação com o grupo que recebeu licopeno isolado</p>	<p>2007</p>	<p>Licopeno</p>
<p>Mandal, A.K.;Das, S.; Mitra, M.; Chakrabarti, R.N.; Chatterjee, M.; Das, N.</p>	<p>Formular lipossomas galactosilados contendo quercetina que apresentem especificidade pelo fígado e investigar sua eficácia terapêutica contra hepatocarcinoma em ratos.</p>	<p>As injeções dos lipossomas impediram o desenvolvimento do hepatocarcinoma e ainda preveniram a ocorrência de danos hepáticos oxidativos em ratos</p>	<p>2008</p>	<p>Quercetina</p>
<p>Priprem, A.; Watanatorn, J.; Sutthiparinyanont, S.; Phachonpai, W.; Muchimapura, S.</p>	<p>Avaliar os efeitos ansiolítico e cognitivo da quercetina isolada (via oral) e da encapsulada em lipossomas (via oral e intranasal) em ratos.</p>	<p>Os lipossomas e a quercetina isolada mostraram significativos efeitos ansiolíticos e cognitivos em ratos. Tendo maior eficácia na entrega de quercetina para SNC os lipossomas de quercetina administrados por via intranasal</p>	<p>2008</p>	<p>Quercetina</p>

Rivera, F.; Costa, G.; Abin, A.; Urbanavicius, J.; Arruti, C.; Casanova, G.; Dajas, F.	Investigar os efeitos protetores cerebrais da quercetina lipossomal em modelos de isquemia.	A administração dos lipossomas em ratos reduziu os danos cerebrais isquêmicos, proporcionou parcial inversão dos déficits motores, além de aumentar significativamente a reserva de glutathione reduzida e a quantidade de células no corpo estriado e no córtex.	2008	Quercetina
Kizelsztejn, P.; Ovadia, H.; Garbuzenko, O.; Sigal, A.; Barenholz, Y.	Avaliar a capacidade de liberação da tempamina lipossomal e analisar o seu potencial para tratar a encefalomielite autoimune experimental.	Os lipossomas liberaram a tempamina de forma lenta e controlada, alcançando a circulação cerebral proporcionando melhora significativas na encefalomielite autoimune, fato atribuído a capacidade antioxidante da tempamina	2009	Tempamina
Peng, C.H.; Chang, C.H.; Peng, R.Y.; Chyau, C.C.	Preparar lipossomas contendo astaxantina com o intuito de melhorar a biodisponibilidade dessa substância nas linhagens celulares Hep3B e HepG2 (carcinoma hepatocelular).	Os lipossomas apresentaram representativa estabilidade, habilidade de transporte e biodisponibilidade para as células Hep3B e HepG2, além de promover melhor ativação de enzimas antioxidantes quando comparados com astaxantina livre.	2010	Astaxantina

Zeevalk, G.D.; Bernard, L.P.; Guilford, F.T.	Investigar a capacidade que lipossomas contendo glutathiona(GSH) possuem de reconstituir a GSH intracelular e proporcionar neuroproteção em modelo <i>in vitro</i> de Doença de Parkinson.	A preparação lipossomal favoreceu de forma eficiente a reposição e a manutenção da glutathiona intracelular. Além de proporcionar de forma segura uma neuroproteção para neurônios mesencefálicos em modelo <i>in vitro</i> de Doença de Parkinson.	2010	Glutathiona
Zhao, G.;Zang, S.Y.; Jiang, Z.H.; Chen, Y.Y.; Ji, X.H.; Lu, B.F.; Wu, J.H.; Qin, G.W.; Guo, L.H.	Investigar o potencial anti-isquêmico de lipossomas contendo luteolina.	A luteolina lipossomal apresentou potencial neuroprotetor anti-isquêmico provavelmente por meio de um reequilíbrio do estado pró-oxidante/antioxidante.	2011	Luteolina
Wang, Y.;Xu, H.; Fu, Q.; Ma, R.; Xiang, J.	Investigar os efeitos protetores do resveratrol e sua forma lipossomal nas células nigrais de ratos com Doença de Parkinson.	Os lipossomas aumentaram a biodisponibilidade do resveratrol e demonstraram potencial para inibir a perda de neurônios dopaminérgicos em ratos com Doença de Parkinson, de forma mais acentuada do que o resveratrol livre, esse efeito pode ser atribuído a ação antioxidante da formulação	2011	Resveratrol

4 CONCLUSÃO

Foi visto que a produção científica de preparações lipossomais que visem à promoção de efeitos antioxidantes e neuroprotetores nos últimos 10 anos tem sido crescente, apresentando bons resultados referentes ao melhoramento das atividades farmacológicas de substâncias de origem naturais e sintéticas, com especial destaque para os compostos isolados de plantas encapsulados em lipossomas convencionais com promissora ação terapêutica em patologias cerebrais isquêmicas e neurodegenerativas. Estes dados reforçam a hipótese da utilização da nanotecnologia como instrumento de enorme potencial para produção de novas alternativas terapêuticas para o tratamento e prevenção de diversas patologias.

REFERÊNCIAS

- BARENHOLZ, Y. C. Doxil®—The first FDA-approved nano-drug: Lessons learned. **Journal of Controlled Release**, v. 160, n. 2, p. 117-134, 2012.
- BRAMBILLA, D.; LE DROUMAGUET, B.; NICOLAS, J.; HASHEMI, S. H.; WU, L. P.; MOGHIMI, S. M.; COUVREUR, P.; ANDRIEUX, K. Nanotechnologies for Alzheimer's disease: diagnosis, therapy, and safety issues. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 7, n. 5, p. 521-540, 2011.
- FREITAS, R. L. M.; SANTOS, Í. M. D. S.; SOUZA, G. F.; TOMÉ, A. D. R.; SALDANHA, G. B.; FREITAS, R. M. Oxidative stress in rat hippocampus caused by pilocarpine-induced seizures is reversed by buspirone. **Brain Research Bulletin**, v. 81, n. 4-5, p. 505-509, 2010.
- FERREIRA, P. B.; ALMEIDA, A. A. C. D.; FREITAS, R. M. D. Antioxidant effect of buspirone in epilepsy model induced by pilocarpine. **Revista de Psiquiatria Clínica**, v. 39, n. 5, p. 153-156, 2012.
- HALLIWELL, B. Free radicals and antioxidants - quo vadis? **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 32, n. 3, p. 125-130, 2011.
- KHAWAJA, A. M. The legacy of nanotechnology: Revolution and prospects in neurosurgery. **International Journal of Surgery**, v. 9, n. 8, p. 608-614, 2011.
- KIZELSZTEIN, P.; OVADIA, H.; GARBUZENKO, O.; SIGAL, A.; BARENHOLZ, Y. Pegylated nanoliposomes remote-loaded with the antioxidant tempamine ameliorate experimental autoimmune encephalomyelitis. **Journal of Neuroimmunology**, v. 213, n. 1-2, p. 20-25, 2009.
- KUMAR, K. P. S.; BHOWMIK, D.; DEB, L. Recent trends in liposomes used as novel drug delivery system. **The Pharma Innovation**, v. 1, n. 1, 2012.
- MANDAL, A. K.; DAS, S.; MITRA, M.; CHAKRABARTI, R. N.; CHATTERJEE, M.; DAS, N. Vesicular flavonoid in combating diethylnitrosamine induced hepatocarcinoma in rat model. **Journal of Experimental Therapeutics & Oncology**, v. 7, n. 2, p. 123, 2008.

- MCCLINTOCK, S. D.; HOESEL, L. M.; DAS, S. K.; TILL, G. O.; NEFF, T.; KUNKEL, R. G.; SMITH, M. G.; WARD, P. A. Attenuation of half sulfur mustard gas-induced acute lung injury in rats. **Journal of Applied Toxicology**, v. 26, n. 2, p. 126-131, 2006.
- MODI, G.; PILLAY, V.; CHOONARA, Y. E.; NDESENDO, V. M. K.; DU TOIT, L. C.; NAIDOO, D. Nanotechnological applications for the treatment of neurodegenerative disorders. **Progress in Neurobiology**, v. 88, n. 4, p. 272-285, 2009.
- NUNES, A.; JAMAL, K. T.A; KOSTARELOS, K. Therapeutics, Imaging & Toxicity of Nanomaterials in the Central Nervous System. **Journal of Controlled Release**, v. 161, n. 2, p. 290-306, 2012.
- OLIVEIRA, L.C.; TAVEIRA, E.J.F.; SOUZA, L.G.; MARRETO, R.N.; LIMA, E.M.; TAVEIRA, S.F. Aplicações das Nanopartículas Lipídicas no Tratamento de Tumores Sólidos: Revisão de Literatura. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 58, n. 4, p. 695-701, 2012.
- PAOLINO, D.; IANNONE, M.; CARDILE, V.; RENIS, M.; PUGLISI, G.; ROTIROTI, D.; FRESTA, M. Tolerability and improved protective action of idebenone-loaded pegylated liposomes on ethanol-induced injury in primary cortical astrocytes. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 93, n. 7, p. 1815-1827, 2004.
- PENG, C. H.; CHANG, C. H.; PENG, R. Y.; CHYAU, C. C. Improved membrane transport of astaxanthine by liposomal encapsulation. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 75, n. 2, p. 154-161, 2010.
- PRIPREM, A.; WATANATORN, J.; SUTTHIPARINYANONT, S.; PHACHONPAI, W.; MUCHIMAPURA, S. Anxiety and cognitive effects of quercetin liposomes in rats. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 4, n. 1, p. 70-78, 2008.
- RENGEL, R. G.; GRČIĆ, J.F.; ČEPELAK, I.; GRUBIŠIĆ, T.Z.; BARIŠIĆ, K. The effect of liposomes with superoxide dismutase on A2182 cells. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 60, n. 1, p. 47-51, 2005.
- RIVERA, F.; COSTA, G.; ABIN, A.; URBANAVICIUS, J.; ARRUTI, C.; CASANOVA, G.; DAJAS, F. Reduction of ischemic brain damage and increase of glutathione by a liposomal preparation of quercetin in permanent focal ischemia in rats. **Neurotoxicity Research**, v. 13, n. 2, p. 105-114, 2008.
- SAHNI, J. K.; DOGGUI, S.; ALI, J.; BABOOTA, S.; DAO, L.; RAMASSAMY, C. Neurotherapeutic applications of nanoparticles in Alzheimer's disease. **Journal of Controlled Release**, v. 152, n. 2, p. 208-231, 2011.
- SARKAR, S.; DAS, N. Mannosylated liposomal flavonoid in combating age-related ischemia–reperfusion induced oxidative damage in rat brain. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 127, n. 4, p. 391-397, 2006.
- TIAN, Y.Y.; GE, L.; DUAN, X.L.; GAO, Z. Q.; CHANG, Y. Z. Lycopene liposomes: lycopene release in vitro and pharmaceutical behaviors and antioxidation in vivo. **Acta Pharmaceutica Sinica**, v. 42, n. 10, p. 1107-1111, 2007.

WANG, Y.; XU, H.; FU, Q.; MA, R.; XIANG, J. Resveratrol derived from rhizoma et radix polygoni cuspidati and its liposomal form protect nigral cells of Parkinsonian rats. **China Journal of Chinese Materia Medica**, v. 36, n. 8, p. 1060, 2011.

ZEEVALK, G. D.; BERNARD, L. P.; GUILFORD, F. T. Liposomal-glutathione provides maintenance of intracellular glutathione and neuroprotection in mesencephalic neuronal cells. **Neurochemical Research**, v. 35, n. 10, p. 1575-1587, 2010.

ZHAO, G.; ZANG, S. Y.; JIANG, Z. H.; CHEN, Y. Y.; JI, X. H.; LU, B. F.; WU, J. H.; QIN, G. W.; GUO, L. H. Postischemic administration of liposome-encapsulated luteolin prevents against ischemia-reperfusion injury in a rat middle cerebral artery occlusion model. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 22, n. 10, p. 929-936, 2011.

CAPÍTULO II:Investigação do mecanismo de ação ansiolítico de uma
formulação lipossomal contendo nimodipina

Investigação do mecanismo de ação ansiolítico de uma formulação lipossomal contendo nimodipina

**OLIVEIRA, G.Z.S.¹; MORENO, L.C.G.A.I.²; OLIVEIRA, J.S.³; ALMEIDA, V.P.A.³;
MAGALHÃES, N.S.S.²; FREITAS, R.M.¹; ROLIM, H.M.L.¹**

¹Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Piauí, Teresina, Piauí, Brasil.

²Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil.

³Curso de Farmácia da Universidade Federal do Piauí, Teresina, Brasil.

RESUMO

A ansiedade é considerada o transtorno psiquiátrico de maior incidência em nível global, sendo responsável por acometer 10 a 30% da população de modo debilitante. Seu tratamento farmacológico apesar de apresentar considerada eficácia pode provocar vários efeitos indesejáveis. Isso traz a necessidade da busca e do desenvolvimento de novos agentes terapêuticos e sistemas de liberação com propriedades ansiolíticas eficazes e com menos efeitos adversos. Nesse sentido, o objetivo desse trabalho foi avaliar o potencial ansiolítico de uma formulação lipossomal contendo nimodipina (LCNa), bem como elucidar seu possível mecanismo de ação, utilizando camundongos (n=7) como modelo animal. Para isso foram aplicadas doses de LCNa (0,1, 1,0 e 10 mg/kg i.p) e nimodipina livre (0,1, 1 e 10 mg/kg, v.o). Foi percebido após 30 minutos das aplicações que os animais que receberam LCNa apresentaram, em todas as doses, aumento do tempo de permanência no campo claro do teste claro/escuro, bem como elevaram o número de entrada e o tempo de permanência no braço aberto do labirinto em cruz elevada, em relação às correspondentes doses de nimodipina e ao controle negativo. No entanto, com relação ao diazepam foi percebido que somente as doses de 1 e 10 mg/kg aumentaram o tempo de permanência no compartimento claro, da mesma forma que todas as doses de LCNa aumentaram o tempo de permanência no braço aberto, enquanto que somente a maior dose aumentou o número de entrada nesse braço. Já os testes do campo aberto e do *rota rod* apontaram que tanto a nimodipina quanto o LCNa aumentaram o número de cruzamento, de *groomings* e de *rearings* quando comparado ao diazepam e não demonstraram alterações significativas com relação ao controle negativo. Em experimentos utilizando flumazenil foi comprovado que o LCNa agiu pelo sistema GABAérgico na promoção da ação ansiolítica, sem comprometer a atividade e a coordenação

motora. A partir desses resultados é possível inferir que essa formulação lipossomal é uma promissora opção terapêutica para tratamento da ansiedade, indicando que a intervenção da nanotecnologia farmacêutica com a utilização de lipossomas exerceu importante influência na propagação da atividade desejada.

PALAVRAS-CHAVE: Campo Aberto; Claro/Escuro; Labirinto em Cruz Elevada; *Rota Rod*.

Abstract: Investigation of the mechanism of anxiolytic action of a liposomal formulation containing nimodipine

Anxiety is considered a psychiatric disorder with the highest incidence global, begin responsible by attacking 10-30% of the population of way debilitating. Its pharmacological treatment despite having considered effective can cause various underside able effects. This brings the need of search and development of new therapeutic agents with anxiolytic properties and with fewer adverse effects. In this sense, the aim of this study was to evaluate the anxiolytic potential of a liposomal formulation containing nimodipine (LCNa) and elucidate its possible mechanism of action, using mice (n=7) as an animal model. For this LCNa doses were applied (0.1, 1.0 and 10 mg/kg i.p) and free nimodipine (0.1, 1 and 10 mg/kg, v.o). Later, it was realized after 30 minutes of applications that animals receiving LCNa presented, at all doses, increased length of stay in the bright field test light/dark, and increased the number of entries and stay time in open arm the elevated plus maze compared to corresponding doses of free nimodipine and negative control. However, with respect to diazepam was seen that only the doses of 1 and 10 mg/kg increased the time spent in the light compartment, as all doses LCNa increased the time spent in the open arm, while only the higher dose increased the number of entries in this arm. The tests in the open field and *rota rod* showed that both free nimodipine as LCNa increased the number of intersection of *groomings* and *rearings* compared to diazepam and not showed significant changes with respect to the negative control. In experiments using flumazenil was proven that LCNa acted by GABAergic system in promoting the anxiolytic action without compromising the activity and motor coordination. From these results it can be inferred that this liposomal formulation may eventually be a good therapeutic option for treating anxiety, indicating that the intervention of pharmaceutical nanotechnology using liposome exercised an important influence on the propagation of desired activity.

KEYWORDS: Light/Dark; Open Field; Plus Maze; *Rota Rod*.

1 INTRODUÇÃO

A ansiedade é considerada o transtorno psiquiátrico de maior incidência em nível global, sendo caracterizada pela fobia desproporcional frente a situações que representem estresse, perigo, ameaças reais ou desafios cotidianos, embora possa ser manifestada também na ausência de real perigo. Possui componentes psicológicos e fisiológicos, na sua forma patológica podem ser observadas reações autônomas como tremores, sudorese e taquicardia, bem como sintomas emocionais, perceptivos, somáticos, cognitivos e comportamentais, podendo inclusive culminar na falência da capacidade adaptativa. Por esses motivos deve ser associada como um problema de saúde pública, uma vez que pode comprometer a qualidade de vida dos indivíduos em suas relações pessoais, sociais ou profissionais (BRAGA et al., 2010; RIBEIRO, 2010; OLATUNJI; CISLER; DEACON, 2010).

A ansiedade patológica acomete 10 a 30% da população de modo debilitante (MULULO et al., 2012). Seu tratamento farmacológico é feito por meio do uso de benzodiazepínicos, buspirona e medicamentos antidepressivos. Apesar desses fármacos apresentarem considerada eficácia, sua administração pode provocar vários efeitos colaterais (RAUPP et al., 2008). O uso dos benzodiazepínicos é passível de sedação, relaxamento muscular, amnésia anterógrada, dependência física, potencialização de outros fármacos de ação central, bem como comprometimento psicomotor e depressivo (SOUSA et al., 2008; YAMADA et al., 2009). Já a utilização da buspirona pode desencadear quadros de tontura, cefaléia, sonolência, distúrbios gastrointestinais, amnésia e insônia (FERREIRA; ALMEIDA; FREITAS, 2012). Essas e outras evidências apontam a necessidade da busca e do desenvolvimento de novos agentes terapêuticos com propriedades ansiolíticas eficazes e com menos efeitos adversos.

Dentro dessa perspectiva, a utilização da nimodipina, um antagonista seletivo dos canais de cálcio do tipo L pertencente à classe das diidropiridinas, pode ser de bastante relevância, uma vez que esse fármaco apresenta importantes efeitos sobre a função neural e possui elevada afinidade pelos sítios de membrana do cérebro. De modo que tem sido amplamente investigada no tratamento de inúmeras disfunções que acometem esse órgão (WANG et al., 2006).

Estudos demonstraram que este fármaco atua preferencialmente nos vasos sanguíneos cerebrais aumentando o fluxo sanguíneo nessa região, sendo utilizado no tratamento de espasmo cerebrovascular, acidente vascular cerebral e em casos de isquemias presentes em inúmeras patologias que afetam o cérebro (YANPALLEWAR et al., 2004). Além disso, um número cada vez maior de pesquisas apontam sua boa aplicação no tratamento da ansiedade

(BIALA; KRUK, 2008), epilepsia (MACHADO et al., 2013), depressão e distúrbios de afetivos ecognitivos (CASAMASSIMA et al., 2010).

Esse fármaco impede a passagem de cálcio nas células por bloquear os canais voltagem-dependentes que estão distribuídos em todos os neurônios e são fundamentais por proporcionar a quantidade de íons de cálcio necessária para que ocorra a liberação regulada dos neurotransmissores. Desempenhando assim uma importante função protetora do sistema nervoso central contra muitos tipos de lesões, uma vez que a passagem de cálcio para o interior da célula, em excesso, pode provocar a morte celular (UEMAETOMARI et al., 2009; OHYAMA et al., 2012).

Embora aponte inúmeras indicações clínicas, algumas propriedades farmacocinéticas da nimodipina reduzem sua eficiência terapêutica, como é o caso da sua baixa biodisponibilidade oral, fazendo com que sejam necessárias doses elevadas para produzir os efeitos desejados, favorecendo o aparecimento de efeitos adversos. Além disso, a nimodipina apresenta insolubilidade em água e baixa estabilidade quando exposto a luminosidade, outros aspectos que comprometem sua atividade farmacológica. Haja vista, pode ser conveniente fazer uso de intervenção com ênfase em nanotecnologia farmacêutica para aprimorar as propriedades intrínsecas desse fármaco (SUN et al., 2013).

Atendendo a essa proposta, a utilização de sistemas farmacêuticos em escala nanométrica, como é o caso dos lipossomas, demonstram bons resultados na encapsulação e na entrega de fármacos insolúveis, fotossensíveis e citotóxicos. De modo a proporcionar maior proteção ao medicamento contra a degradação extracelular, reduzir a frequência de administração e a duração do tratamento. Outro benefício significativo é a liberação controlada do fármaco, uma vez que esta aumenta a sua biodisponibilidade, por manter os níveis séricos do fármaco constante, o que diminui as chances de toxicidade (MAGALHÃES; MOSQUEIRA, 2010). Diante disso, o encapsulamento da nimodipina em lipossomas proporcionará um melhor perfil farmacocinético e farmacodinâmico desse fármaco, de forma a aperfeiçoar sua ação terapêutica. Partindo dessa perspectiva, foi delineada uma formulação lipossomal derivada de nimodipina (LCNa) com o objetivo de avaliar seu potencial ansiolítico, bem como a elucidar seu mecanismo de ação.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Animais

Foram utilizados camundongos *Swiss* machos com dois meses de idade e com peso de 25 a 30 g, provenientes do Biotério Central do Centro de Ciências Agrárias da Universidade

Federal do Piauí. Os animais destinados ao experimento permaneceram nas dependências do biotério do Laboratório de Pesquisa em Neuroquímica Experimental, por sete dias, para a adequada aclimação. As unidades experimentais receberam água e dieta (Labina[®]) *ad libitum* e foram mantidos sob condições controladas de iluminação (ciclo 12h claro/escuro) e temperatura (25 ± 1 °C). Os protocolos experimentais e procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal do Piauí (CEEA/UFPI N° 014/11).

2.2 Produção da formulação lipossomal derivada de nimodipina (LCNa)

Os lipossomas contendo nimodipina (LCNa) foram preparados usando o método de hidratação de filme lipídico (LIRA et al., 2009). Os lipossomas foram produzidos sem carga, utilizando os lipídeos fosfatidilcolina de soja e colesterol (proporção de 8:2) e 0,010 g de nimodipina para a obtenção de uma formulação lipossomal com concentração de lipídeos de 117,6 mM e concentração do fármaco de 1,0 mg/mL. Esses constituintes foram solubilizados em uma mistura de clorofórmio: metanol (3:1 v/v), sob agitação magnética. Os solventes foram removidos por evaporação a vácuo, utilizando o rotaevaporador durante 60 min (37 ± 1 °C, 80 rpm), resultando na formação de filme lipídico. Este filme foi, então, hidratado com 10 mL de solução tampão fosfato pH 7,4 produzindo assim vesículas multilamelares grandes. Por fim, a suspensão lipossomal foi submetida à sonicação por sonda ultrassônica (Vibra Cell, BRANSON, EUA) a 200 W e 40 Hz por 300 s para a obtenção de lipossomas unilamelares pequenos.

2.3 Protocolo experimental

Os animais foram tratados de forma aguda, sendo cada grupo constituído por sete camundongos. Os protocolos de tratamento foram realizados da seguinte forma: solução salina 0,9% (i.p; controle negativo; veículo), diazepam 2 mg/kg (i.p; controle positivo), nimodipina livre (v.o) e LCNa (i.p) nas doses 0,1, 1 e 10 mg/kg. Após 30 minutos das aplicações, os animais foram submetidos aos testes comportamentais para avaliação da atividade ansiolítica e dos parâmetros relacionados à atividade e coordenação motora.

Para investigar o possível envolvimento dos lipossomas contendo nimodipina com os sítios dos receptores GABA_A, foi realizado pré-tratamento com flumazenil (2,5 mg/kg i.p) 15 minutos antes das aplicações de LCNa (i.p) e diazepam (2 mg/kg i.p), bem como um outro grupo foi tratado apenas com flumazenil na dose de 2,5 mg/kg (i.p). Dessa forma, as avaliações comportamentais nos testes de Campo Aberto, Claro/Escuro, Labirinto em Cruz Elevada e *Rota Rod* foram realizadas 30 minutos após a administração das últimas drogas.

2.4 Avaliação do Efeito Ansiolítico

2.4.1 Teste do Claro/Escuro

O aparato usado nesse teste é feito de acrílico dividido em 2 compartimentos (campo claro e campo escuro) que se comunicam por meio de uma pequena porta (ALMEIDA et al., 2012), o compartimento escuro (acrílico preto, 27 x 18 x 29 cm) é pouco iluminado, enquanto que o campo claro (acrílico transparente, 27 x 18 x 29 cm) é iluminado pela luz do ambiente (**Ilustração 1**). Os animais foram observados por 5 minutos, sendo utilizado como parâmetro seu tempo de permanência, em segundos, no campo claro. Depois de cada animal realizar seu teste individual, o equipamento foi limpo e desinfetado com álcool 70%.

Ilustração 1: Equipamento do Claro/Escuro



Fonte: Arquivo Pessoal

2.4.2 Teste do labirinto em cruz elevado

O labirinto em cruz elevado (LCE) para camundongos consiste de dois braços abertos opostos (30 x 5 cm) e dois fechados (30 x 5 x 25 cm), também opostos, em forma de cruz (CAMPELO et al., 2011). Os braços abertos e fechados estão conectados entre si por uma plataforma central (5 x 5 cm), elevada a 45 cm do chão (**Ilustração 2**). Os animais foram colocados no centro do aparelho com a cabeça voltada para um dos braços fechados e o seu comportamento foi observado por 5 minutos. As medidas comportamentais registradas no LCE foram o número de entradas nos braços abertos (NEBA) e o tempo de permanência do animal nesses braços (TPBA). Depois que cada animal realizou seu teste individual, o aparato foi limpo e desinfetado com álcool 70%.

Ilustração 2: Equipamento do Labirinto de Cruz Elevada



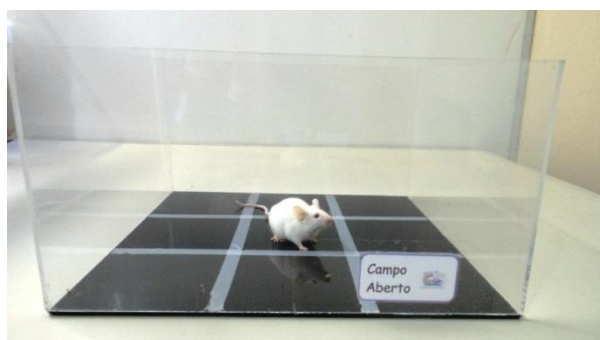
Fonte: Arquivo Pessoal

2.5 Avaliação da Atividade e Coordenação Motora

2.5.1. Teste do campo aberto

A atividade motora dos animais foi verificada por meio de um campo aberto feito de acrílico (paredes transparentes e piso preto, 30 x 30 x 15 cm) dividido em 9 quadrantes iguais (**Ilustração 3**), baseado no modelo descrito por Silva et al., 2012. Os animais, um por vez, foram colocados no centro do campo aberto sendo quantificado o número de cruzamentos com as quatro patas (atividade locomotora espontânea), o número de comportamento de autolimpeza (*grooming*) e o número de levantamentos (*rearing*), sem encostar-se à parede, durante o tempo de 5 minutos. Depois que cada animal realizou seu teste individual, o campo foi limpo e desinfetado com álcool 70%.

Ilustração 3: Equipamento do Campo Aberto



Fonte: Arquivo Pessoal

2.5.2 Teste do Rota Rod

Na barra giratória foram avaliados a coordenação motora e o possível relaxamento muscular (MARQUES; MELO; FREITAS, 2012). Os animais foram colocados um de cada vez, com as quatro patas apoiadas sobre uma barra giratória de 2,5 cm de diâmetro, elevada a 25 cm do piso, em uma rotação de 16 rpm (**Ilustração 4**), durante três minutos. Todos os

animais passaram por um pré-teste na barra giratória para se habituarem as condições do equipamento antes de realizarem os experimentos. Os critérios para avaliação desse teste foram o tempo de permanência na barra giratória, em segundos, e o número de quedas. Depois que cada animal realizou seu teste individual, a barra giratória e o aparelho foram limpos e desinfetados com álcool 70%.

Ilustração 4: Equipamento do Rota Rod



Fonte: Arquivo Pessoal

2.6 Análise Estatística

Todos os resultados foram apresentados com média \pm erro padrão da média (E.P.M.). Os dados obtidos foram avaliados por meio da análise de variância (ANOVA) seguida do teste *t-Student-Neuman-Keuls* como *post hoc* teste. Os dados foram analisados utilizando o *Software GraphPadPrism* (versão 5.0) e as diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$.

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1 Caracterização da formulação

Os lipossomas contendo nimodipina utilizados na realização dos testes comportamentais apresentam a seguinte caracterização físico-química: tamanho de partícula de $107,17 \pm 1,53$ nm, índice de polidispersão $0,303 \pm 0,002$ nm, potencial zeta $-5,32 \pm 1,29$ mV, pH 7,4, teor de fármaco de $99 \pm 0,21\%$ e taxa de encapsulação de $99 \pm 0,21\%$. Indicando que os LCNa se classificam como lipossomas unilamelares pequenos (SUV), com tamanho, homogeneidade e carga de superfície favoráveis para utilização em testes *in vivo*, além de apresentarem alto rendimento, elevada taxa de fármaco encapsulado e manutenção da estabilidade da formulação por um período de 15 dias sem alterar suas características micro e

macroscópicas. Os resultados obtidos dessa pesquisa resultaram em pedido de patente, com o seguinte número de processo: BR 10 2012 021840 2.

3.2 Teste do Claro/Escuro

O Claro/Escuro é um importante teste que avalia a ansiedade em nível comportamental. Ele se fundamenta na análise do comportamento exploratório espontâneo dos roedores frente a um ambiente novo e iluminado, podendo esses animais desenvolver aversão ou aceitação em face dessas novas condições. No entanto, é sabido que em situações normais a tendência natural dos ratos e dos camundongos é ter uma predileção por áreas pouco iluminadas e familiares. Uma vez expostos ao aparato do Claro/Escuro os animais entram em conflito em consequência da propensão exploratória natural deles e a tendência de esquivar-se diante de ambientes desconhecidos (neofobia). Vários estudos atestam que drogas ansiolíticas estimulam um maior número de transições entre esses dois ambientes, bem como aumentam o tempo exploratório no campo claro (PULTRINI; GALINDO; COSTA, 2006; BOURIN et al., 2007; GOMES et al., 2011).

Nesse experimento, a administração de nimodipina livre nas três doses testadas não produziu alterações estatisticamente significantes no tempo de permanência dos animais no campo claro quando comparadas com o controle negativo ($p < 0,05$) (**Tabela 1**). Isso pode ser atribuído às pequenas doses utilizadas, a via de administração convencional e baixa solubilidade da nimodipina em água que pode não ter permitido sua dissolução e consequente promoção desse efeito farmacológico. De acordo com Kozlovskiĭ (1997) outros bloqueadores dos canais de cálcio, como verapamil, nifedipina, cinarizina e fendilina também não apresentaram efeitos ansiolíticos e anticonvulsivantes.

Entretanto, há evidências de que os antagonistas dos canais de cálcio tipo-L, como a nimodipina (1,5 a 20 mg /kg), atuam na amígdala desempenhando importante influência no condicionamento do medo, tendo assim, consideráveis efeitos no tratamento da ansiedade e da aprendizagem emocional (GALLAGHER et al., 2006). A nimodipina também foi eficiente na reversão da situação de estresse psicológico, de modo a confirmar a relação protetora dos bloqueadores de cálcio frente a patologias relacionadas ao estresse (MARINO; PISANTI; CAPONE, 1991).

A escolha do diazepam como controle positivo foi atribuída ao fato desse medicamento ter seu efeito ansiolítico previamente estabelecido, com ampla utilização na prática clínica e em experimentos comportamentais para o estudo de novas substâncias com potencial ansiolítico (ZUO et al., 2010). Sendo, dessa forma, administrado como droga de referência no teste do claro/escuro, proporcionando o aumento do tempo de permanência no

compartimento claro. Como pode ser visto na **Tabela 1**, na qual a administração do diazepam aumentou em 34,6% o tempo de permanência dos animais no campo claro com relação ao controle negativo ($p < 0,05$).

No entanto, apesar de sua aplicação no tratamento da ansiedade já ser bem aceita nas últimas décadas, o uso crônico de diazepam ou a administração de doses elevadas pode acarretar diversos efeitos adversos como relaxamento muscular, sedação, dependência física e amnésia anterógrada (BENCAN; SLEDGE; LEVIN, 2009).

Esses inconvenientes podem ser contornados pela utilização do LCNa, uma vez que este demonstrou efeito ansiolítico com utilização de uma quantidade de nimodipina 87 vezes menor, independente da dose, quando comparado com as respectivas soluções do fármaco. Pode se chegar a essa conclusão levando em consideração que em 1mg de LCNa, formado por fosfatidocolina, colesterol e nimodipina, contém apenas 0,01151 mg de nimodipina. Esta menor quantidade de droga aplicada minimiza as chances de manifestações de efeitos adversos, além de reforçar a importância desses nanossistemas em superar as limitações dessa medicação.

Quando comparado com a nimodipina livre, pode se perceber um aumento do tempo de permanência de 31,1% no grupo de LCNa 0,1 mg/kg, 51,5% no grupo LCNa 1 mg/kg e 36,5% no grupo LCNa 10 mg/kg. Merecendo destaque a dose intermediária e a maior, por demonstrarem efeitos ansiolíticos superiores ao diazepam, com aumentos de 19,4% e 19,7%, respectivamente ($p < 0,05$) (**Tabela 1**). Já quando as doses lipossomais estudadas são comparadas com o controle negativo foram observados aumentos respectivos de 34,4%; 60,8% e 61,1% do tempo de permanência no campo claro ($p < 0,05$) (**Tabela 1**).

De acordo com Wang e colaboradores (2006) lipossomas contendo nimodipina possuem pequeno tamanho e alta eficiência de encapsulação, além de demonstrarem capacidade de melhorar a solubilidade desse medicamento e elevar seu tempo de permanência na circulação, por promoverem sua liberação controlada conferindo manutenção dos níveis séricos do fármaco, fato positivo uma vez que a nimodipina administrada de forma convencional é rapidamente eliminada do sangue. Foi comprovado também que os lipossomas podem entregar nimodipina ao cérebro de forma eficiente, apontando uma correlação linear da concentração da droga no tecido cerebral e no plasma de ratos.

Por outro lado, a finalidade da utilização do co-tratamento com flumazenil foi de averiguar se o efeito ansiolítico do LCNa está associado a sua interação com o sistema GABAérgico. Visto que o flumazenil atua no sistema nervoso central como antagonista dos compostos benzodiazepínicos, exercendo uma inibição competitiva, de modo a ligar-se ao complexo receptor GABA/benzodiazepínico, impedindo o reconhecimento e consequente

ação dos fármacos benzodiazepínicos (KAMEI; MIYATA; OHSAWA, 2009; MÖHLER, 2012).

De acordo com os dados expostos pode ser sugerido que o LCNa atua no sistema GABAérgico, já que o co-tratamento com flumazenil reverteu a tendência comportamental dos animais no campo claro em todas as doses correspondentes dos lipossomas, com diminuições de 23,6%, 29,7% e 31,0% do tempo de permanência no campo claro, respectivamente ($p < 0,05$) (**Tabela 1**). Além disso, pode se associar que a formulação obteve o mesmo mecanismo de ação dos compostos benzodiazepínicos, uma vez que o flumazenil bloqueou o efeito ansiolítico tanto do diazepam quanto dos LCNa em todas as doses.

Tabela 1: Efeitos da nimodipina, formulação lipossomal contendo nimodipina (LCNa), flumazenil, diazepam e suas associações em camundongos no teste do claro/escuro.

Grupos (n=7)	Tempo de permanência no campo claro (s)
Veículo (0,25 mL)	92,50 ± 2,59
Diazepam 2 mg/kg	124,5 ± 6,75 ^a
Nimodipina 0,1 mg/kg	94,83 ± 3,26
Nimodipina 1 mg/kg	98,17 ± 3,20
Nimodipina 10 mg/kg	109,2 ± 5,60
LCNa 0,1 mg/kg	124,3 ± 4,85 ^{a,c}
LCNa 1 mg/kg	148,7 ± 8,36 ^{a,b,d}
LCNa 10 mg/kg	149,0 ± 7,20 ^{a,b,e}
Flumazenil 2,5 mg/kg	92,50 ± 0,76
Flumazenil 2,5 mg/kg + Diazepam 2 mg/kg	91,83 ± 2,69 ^b
Flumazenil 2,5 mg/kg + LCNa 0,1 mg/kg	95,00 ± 1,21 ^f
Flumazenil 2,5 mg/kg + LCNa 1,0 mg/kg	104,5 ± 7,20 ^g
Flumazenil 2,5 mg/kg + LCNa 10 mg/kg	102,8 ± 2,81 ^h

Os resultados foram expressos como a média ± E.P.M. (Erro Padrão da Média) do número de animais usados em cada grupo nos experimentos. ^a $p < 0,05$ quando comparado ao grupo controle; ^b $p < 0,05$ quando comparado ao grupo diazepam; ^c $p < 0,05$ quando comparado ao grupo nimodipina 0,1 mg/kg; ^d $p < 0,05$ quando comparado ao grupo nimodipina 1 mg/kg; ^e $p < 0,05$ quando comparado ao grupo nimodipina 10 mg/kg; ^f $p < 0,05$ quando comparado ao grupo LCNa 0,1 mg/kg; ^g $p < 0,05$ quando comparado ao grupo LCNa 1 mg/kg; ^h $p < 0,05$ quando comparado ao grupo LCNa 10 mg/kg (ANOVA seguido do teste *t*-Student-Newman-Keuls como *post hoc* teste).

3.3 Teste do Labirinto em Cruz Elevada

O Teste do labirinto em cruz elevada (LCE) também chamado de *plus maze* é um ensaio experimental que de forma semelhante ao teste do claro/escuro analisa o comportamento dos animais em um ambiente desconhecido, levando em consideração a aversão natural de camundongos e ratos por lugares abertos. A avaliação da propriedade ansiolítica de drogas é realizada pela quantificação do número de entrada e do tempo de permanência no braço aberto do LCE. Quanto maior a capacidade exploratória dos animais, menores serão seus níveis de ansiedade (GOUVEIA JÚNIOR; MORATO, 2002; RIBEIRO, 2010).

Ao ser colocado no LCE, o animal se orienta preferencialmente para regiões desse aparato que demonstre maior segurança e proteção, direcionando-se preferencialmente para os braços fechados do labirinto, de forma que substâncias ansiogênicas reforcem essa tendência e substâncias ansiolíticas revertam esse quadro, aumentando a capacidade exploratória do animal nos braços abertos (LALONDE; STRAZIELLE, 2009).

De acordo com os dados obtidos é possível inferir que o diazepam produziu aumento significativo do número de entrada e do tempo de permanência no braço aberto, proporcional a 29,18% e 131,78%, respectivamente, com relação ao controle negativo ($p < 0,05$). Da mesma forma que as doses de nimodipina livres testadas tiveram elevação do tempo de permanência no braço aberto de respectivamente 69,95%, 116,25% e 106,01% (controle negativo) ($p < 0,05$), indicando efeito ansiolítico do medicamento (**Tabela 2**).

Outro estudo também utilizando esse teste comportamental apontou que a administração de nimodipina (5 e 10 mg/kg, i.p.), flunarizina (5 e 10 mg/kg, i.p.), verapamil (5, 10 e 20 mg/kg) e diltiazem (5, 10 e 20 mg/kg, i.p.) antes de doses de nicotina e de anfetamina promoveram diminuições dos efeitos ansiogênicos dessas drogas psicoestimulantes em ratos, por aumentaremos percentuais de entrada e de permanência no braço aberto desses animais no LCE (BIALA; KRUK, 2008).

Já com relação às doses crescentes de LCNa podem ser evidenciados aumentos no número de entrada no braço aberto de 21,84%, 34,13% e 41,47%, além de elevações do tempo de permanência de 176,28%, 193,60% e 216,60%, respectivamente, quando comparadas com o controle negativo ($p < 0,05$) (**Tabela 2**).

Do mesmo modo que esses lipossomas também produziram aumentos significativos no número de entrada (117,06%, 111,88% e 81,40%, respectivamente) e no tempo de permanência no braço aberto (62,57%, 35,76% e 53,68%, respectivamente) quando comparado com as doses correspondentes de nimodipina livre. Aliado ao fato dos lipossomas proporcionarem também aumentos significativos do tempo de permanência no braço aberto

(19,19%, 26,67% e 36,59%, respectivamente) quando comparadas com o grupo do diazepam ($p < 0,05$) (Tabela 2).

Isso confirma os resultados obtidos no teste claro/escuro, sugerindo que quando aplicados por via intraperitoneal de LCNa possui efeitos ansiolíticos. Segundo Magalhães e colaboradores(2010) a utilização de lipossomas também melhora a proteção do fármaco contra a degradação extracelular, além de propiciar uma diminuição da frequência de aplicação de doses e duração do tratamento, pelo fato da liberação da droga ocorrer de forma controlada.

Os grupos que tiveram co-tratamento com flumazenil (2,5 mg/kg) apresentaram diminuições significativas do número de entradas (20,02%, 19,97% e 32,81%) e do tempo de permanência nos braços abertos (60,73%, 64,25%, 66,29%) em relação às doses correspondente de LCNa. Sugerindo novamente que o efeito ansiolítico dos lipossomas foi revertido pelo flumazenil, reforçando a hipótese de que o LCNa atua no sistema GABAérgico.

Tabela 2: Efeitos da nimodipina, formulação lipossomal contendo nimodipina (LCNa), flumazenil, diazepam e suas associações em camundongos no teste do labirinto em cruz elevada.

Grupos (n=7)	Número de entradas nos braços abertos	Tempo de permanência nos braços abertos(s)
Veículo (0,25 mL)	5,86 ± 0,40	40,43 ± 3,75
Diazepam 2 mg/kg	7,57 ± 0,65 ^a	93,71 ± 1,51 ^a
Nimodipina 0,1 mg/kg	3,29 ± 0,36	68,71 ± 5,41 ^a
Nimodipina 1 mg/kg	3,71 ± 0,68	87,43 ± 3,68 ^a
Nimodipina 10 mg/kg	4,57 ± 0,43	83,29 ± 10,02 ^a
LCNa 0,1 mg/kg	7,14 ± 0,88 ^{a,c}	111,7 ± 2,05 ^{a,b,c}
LCNa 1 mg/kg	7,86 ± 0,86 ^{a,d}	118,7 ± 5,74 ^{a,b,d}
LCNa 10 mg/kg	8,29 ± 0,92 ^{a,b,e}	128,0 ± 8,98 ^{a,b,e}
Flumazenil 2,5 mg/kg	5,86 ± 0,55	39,14 ± 3,54
Flumazenil 2,5 mg/kg + Diazepam 2 mg/kg	5,86 ± 0,74 ^b	41,00 ± 1,76 ^b
Flumazenil 2,5 mg/kg + LCNa 0,1 mg/kg	5,71 ± 0,68 ^f	43,86 ± 1,10 ^f
Flumazenil 2,5 mg/kg + LCNa 1,0 mg/kg	6,29 ± 0,60 ^g	42,43 ± 1,34 ^g
Flumazenil 2,5 mg/kg + LCNa 10 mg/kg	5,57 ± 0,37 ^h	43,14 ± 1,30 ^h

Os resultados foram expressos como a média ± E.P.M. (Erro Padrão da Média) do número de animais usados em cada grupo nos experimentos. ^a $p < 0,05$ quando comparado ao

grupo controle; ^bp<0,05 quando comparado ao grupo diazepam; ^cp<0,05 quando comparado ao grupo nimodipina 0,1 mg/kg; ^dp<0,05 quando comparado ao grupo nimodipina 1 mg/kg; ^ep<0,05 quando comparado ao grupo nimodipina 10 mg/kg; ^fp<0,05 quando comparado ao grupo LCNa 0,1 mg/kg; ^gp<0,05 quando comparado ao grupo LCNa 1 mg/kg; ^hp<0,05 quando comparado ao grupo LCNa 10 mg/kg (ANOVA seguido do teste *t*-Student-Newman-Keuls com *post hoc* teste).

3.4 Campo Aberto

O campo aberto é um ensaio comportamental que avalia o grau de sedação, a capacidade de deambulação e a atividade exploratória espontânea geral dos roedores em um ambiente aberto sob administrações de fármacos com efeitos ansiolíticos ou ansiogênicos. É útil para realização de triagem farmacológica de compostos que atuam no sistema nervoso central, bem como fornece importantes informações sobre o estado ansiolítico e miorelaxante dos animais avaliados, levando em consideração o número de cruzamentos, de *grooming* e de *rearing* (ANGRINI; LESLIE; SHEPHARD, 1998; HAN et al., 2009).

Já o número de cruzamentos realizados pelos roedores está intimamente relacionado ao componente psicoemocional, de modo que quanto maior o número de campos deslocados maior é o estímulo recebido por esses animais (RICCI et al., 2013). Enquanto que o *grooming* é um movimento de autolimpeza que é manifestado de acordo com o nível de ansiedade dos animais em determinada situação, refletindo uma resposta comportamental provocada por estímulos ansiogênicos (ZANETTINI et al., 2009). De acordo com a literatura o *grooming* é um movimento modulado por vários neurotransmissores, com a dopamina exercendo especial influência, porém somente com esse parâmetro não é possível associar o envolvimento do sistema dopaminérgico (SERAFIM; FELICIO, 2001; GOMES et al., 2008).

O *rearing* acontece quando o roedor realiza levantamentos no campo aberto, de modo a apoiar somente as patas traseiras na superfície, mantendo as duas dianteiras levantadas sem encostar nas paredes do aparato. Nesse teste, o número de *rearing* reflete o nível de excitabilidade do sistema nervoso central (MASUR et al., 1971; GOULD; DAO; KOVACSICS, 2009).

Nos grupos das soluções de nimodipina livre e de LCNa foram obtidas médias do número de cruzamento, de *grooming* e de *rearing* muito próximas a grupo do controle negativo, sem encontrar diferença estatística significativa (**Tabela 3**). O que demonstra que as soluções de nimodipina e os LCNa nas doses estudadas não influenciaram a atividade e a coordenação motora dos animais, podendo portanto ser muito útil na prática clínica.

Corroborando com esses resultados, Kumar e colaboradores (2011) verificaram que a administração de nimodipina (10 mg/kg) é eficiente para prevenir a diminuição da atividade exploratória locomotora em ratos submetidos a situações de estresse (técnica de imobilização), além de promover a redução do déficit de memória e normalizar os níveis de corticosterona. Segundo Czyrak e colaboradores (1990) os antagonistas dos canais de cálcio como nifedipina, nimodipina e diltiazem (10 mg/kg) não modificaram o comportamento normal dos ratos no teste do campo aberto.

Além disso, foi verificado também que a administração crônica de nimodipina em ratos idosos preveniu o declínio da aprendizagem relacionada à idade e aumentou o desempenho no labirinto em cruz elevada, sem interferir de forma significativa nos efeitos comportamentais de locomoção, embora na maior dose estudada (40 mg/kg) (INGRAM et al., 1994).

Foi possível observar também que o grupo do diazepam produziu diminuição significativa em todos os parâmetros utilizados no teste, com redução de 51,80% do número de cruzamentos com as quatro patas, 52,63% do número de *grooming* e 50% o número de *rearing*, quando comparados com o grupo controle negativo ($p < 0,05$). O que indica comprometimento dos movimentos exploratórios espontâneo dos animais, com possíveis evidências de relaxamento muscular com déficit da atividade locomotora (**Tabela 3**).

Efeitos confirmados por experimentos que utilizaram o campo aberto para avaliar a atividade locomotora de animais que tiveram administrações de diazepam (1 e 2 mg/kg) e buspirona (1,25 e 2,5 mg/kg), com os resultados apontando que todas as doses dos dois medicamentos promoveram diminuições da capacidade de deambulação dos animais. Sendo observada também redução da quantidade de *rearing* nas duas doses de buspirona e na maior dose de diazepam (HUGHES, 1993).

Analisando o teste do campo aberto é possível inferir que os grupos de nimodipina livre e de LCNa, em todas as doses, promoveram aumentos significativos no número de cruzamentos (indicando elevação da atividade locomotora espontânea), bem como elevaram o comportamento de autolimpeza (*grooming*) e o número de levantamento (*rearing*), em relação ao grupo de diazepam. Sugerindo que tanto as soluções de nimodipina quanto os lipossomas demonstraram menor capacidade de deprimir o sistema nervoso central que o diazepam, e conseqüentemente, essas substâncias apresentam menores chances de causar efeitos adversos que este ansiolítico padrão (**Tabela 3**).

Já o co-tratamento com flumazenil teve como objetivo avaliar se os receptores GABA_A tem influência sobre a atividade locomotora dos animais que receberam LCNa. Ao final desse experimento, foi possível afirmar que não existe ligação entre os LCNa com os sítios benzodiazepínicos dos receptores GABA_A envolvidos com os efeitos sedativos, visto que

não houveram alterações significativas dos parâmetros avaliados no campo aberto, tendo resultados semelhantes aos do grupo controle, não influenciando a atividade locomotora dos animais (**Tabela 3**).

Pode ser ainda proposto que o LCNa exerceu preferência pela subunidade α_2 dos receptores GABA_A referente a promoção de efeito ansiolítico e não tenha envolvimento com os efeitos depressores da atividade locomotora. Uma vez que de acordo com Rudolph e colaboradores (2011) a subunidade α_1 dos receptores GABA_A é responsável pelos efeitos sedativos e anticonvulsivantes, e a subunidade α_2 está envolvida com a atividade ansiolítica.

Tabela 3: Efeitos da nimodipina, formulação lipossomal contendo nimodipina (LCNa), flumazenil, diazepam e suas associações em camundongos no teste do campo aberto.

Grupos (n=7)	Número de cruzamentos	Número de groomings	Número de rearings
Veículo (0,25 mL)	63,14 ± 2,60	3,80 ± 0,75	25,60 ± 1,63
Diazepam 2 mg/kg	30,43 ± 1,21 ^a	1,80 ± 0,37 ^a	12,80 ± 0,97 ^a
Nimodipina 0,1 mg/kg	63,71 ± 2,35 ^b	3,80 ± 0,58 ^b	25,60 ± 1,69 ^b
Nimodipina 1 mg/kg	63,86 ± 3,04 ^b	4,20 ± 0,66 ^b	25,20 ± 1,77 ^b
Nimodipina 10 mg/kg	63,71 ± 3,38 ^b	4,00 ± 0,83 ^b	24,80 ± 1,35 ^b
LCNa 0,1 mg/kg	66,71 ± 1,60 ^b	4,00 ± 0,55 ^b	24,20 ± 1,88 ^b
LCNa 1 mg/kg	67,86 ± 2,44 ^b	4,00 ± 0,31 ^b	24,20 ± 2,31 ^b
LCNa 10 mg/kg	66,57 ± 3,95 ^b	4,00 ± 0,70 ^b	25,20 ± 1,68 ^b
FLU 2,5 mg/kg	67,29 ± 4,79 ^b	4,20 ± 0,58 ^b	26,60 ± 1,29 ^b
FLU 2,5 mg/kg + DZP 2 mg/kg	74,29 ± 3,97 ^b	4,20 ± 0,37 ^b	27,00 ± 1,76 ^b
FLU 2,5 mg/kg + LCNa 0,1 mg/kg	71,57 ± 3,43 ^b	4,20 ± 0,66 ^b	27,60 ± 1,07 ^b
FLU 2,5 mg/kg + LCNa 1,0 mg/kg	72,00 ± 2,86 ^b	4,20 ± 0,73 ^b	27,40 ± 0,98 ^b
FLU 2,5 mg/kg + LCNa 10 mg/kg	71,71 ± 4,97 ^b	4,20 ± 0,58 ^b	25,60 ± 1,88 ^b

Os resultados foram expressos como a média ± E.P.M. (Erro Padrão da Média) do número de animais usados em cada grupo nos experimentos. ^ap<0,05 quando comparado ao grupo controle; ^bp<0,05 quando comparado ao grupo diazepam (ANOVA seguido do teste *t*-Student-Newman-Keuls como *post hoc* teste).

3.5 Rota Rod

O *rota rod* é um teste comportamental descrito pela primeira vez por Dunham; Miya em 1957, este ensaio é fundamentado no fato de que quando um animal recebe uma droga que deprime o sistema nervoso central este cai facilmente quando colocado em uma barra giratória a uma velocidade constante (CHATTERJEE et al., 2013). É um ensaio muito utilizado para avaliar o desempenho psicomotor, o efeito miorelaxante, a incoordenação motora e a capacidade de equilíbrio provocado por fármacos administrados em modelos animais (KUDAGI; KUMAR; BASHA, 2012).

A partir dos dados expostos, é possível inferir que as soluções de nimodipina livre e os lipossomas contendo nimodipina não interferiram no desempenho dos animais no *rota rod*, de modo que não influenciaram no tônus muscular e no estado de sedação dos animais, mantendo a integridade da coordenação motora, por não alterar em de forma significativa o número de quedas e o tempo de permanência da barra giratória, quando comparados como controle negativo.

Já o grupo do diazepam, quando comparado ao grupo controle, foi observado um aumento no número de quedas de 42,06% e uma diminuição do tempo de permanência na barra giratória de 26,34% ($p < 0,05$). Indicando déficit motor nos animais, demonstrado pelo relaxamento muscular e pela diminuição do equilíbrio na barra giratória (**Tabela 4**). Corroborando com trabalhos desenvolvidos por Talarek e colaboradores(2010) que apontam o diazepam como responsável pela deficiência da capacidade motora e promover sedação em ratos que foram avaliados pelo *rota rod*.

Os benzodiazepínicos são considerados uma opção terapêutica muito adotada na prática clínica, porém a sua baixa seletividade é responsável pelas manifestações de reações diversas como o relaxamento muscular, a redução da atividade locomotora, amnésia anterógrada e a sedação, além de seu uso prolongado poder desencadear dependência e tolerância (SOUTO-MAIOR et al., 2011). Portanto o desenvolvimento de novos fármacos ansiolíticos que não provoquem esses efeitos secundários seriam muito úteis para adesão do paciente ao tratamento (CLOOS; FERREIRA, 2009).

É confirmado também nesse experimento o não envolvimento dos receptores GABA_A com os efeitos sedativos dos LCNa, visto que a utilização do flumazenil não inverteu os efeitos locomotores dos lipossomas, de modo a não alterar significativamente o número de quedas e o tempo de permanência na barra giratória. O que indica que o LCNa e o diazepam não atuam pelo mesmo mecanismo de ação, uma vez que o co-tratamento com flumazenil reverteu os efeitos sedativos do diazepam.

Resultado positivo, levando em consideração que os principais alvos para desenvolvimento de novos medicamentos ansiolíticos buscam fármacos que atuem de maneira específica nas subunidades α_2 e α_3 dos receptores GABA_A, uma vez que estas são responsáveis para mediar os efeitos ansiolíticos dos benzodiazepínicos, sem interferir nos efeitos sedativos (ATACK, 2010).

Tabela 4: Efeitos da nimodipina, formulação lipossomal contendo nimodipina (LCNa), flumazenil, diazepam e suas associações em camundongos no teste do *rota rod*.

Grupos (n=7)	Número de quedas	Tempo de permanência (s)
Veículo (0,25 mL)	1,57 ± 0,30	177,3 ± 1,00
Diazepam 2 mg/kg	2,71 ± 0,28 ^a	130,6 ± 4,45 ^a
Nimodipina 0,1 mg/kg	1,57 ± 0,20	173,7 ± 1,94
Nimodipina 1 mg/kg	1,57 ± 0,42	175,4 ± 0,97
Nimodipina 10 mg/kg	1,71 ± 0,18	176,6 ± 1,44
LCNa 0,1 mg/kg	1,71 ± 0,28	170,1 ± 3,77
LCNa 1 mg/kg	1,71 ± 0,42	170,9 ± 3,78
LCNa 10 mg/kg	1,86 ± 0,34	174,1 ± 2,70
Flumazenil 2,5 mg/kg	2,00 ± 0,43	173,5 ± 1,61
FLU 2,5 mg/kg + DZP 2 mg/kg	1,71 ± 0,28 ^b	174,6 ± 2,03 ^b
FLU 2,5 mg/kg + LCNa 0,1 mg/kg	1,86 ± 0,26	175,0 ± 1,34
FLU 2,5 mg/kg + LCNa 1,0 mg/kg	1,85 ± 0,40	175,5 ± 1,00
FLU 2,5 mg/kg + LCNa 10 mg/kg	1,89 ± 0,31	169,7 ± 6,33

Os resultados foram expressos como a média ± E.P.M. (Erro Padrão da Média) do número de animais usados em cada grupo nos experimentos. ^ap<0,05 quando comparado ao grupo controle; ^bp<0,05 quando comparado ao grupo diazepam (ANOVA seguido do teste *t*-Student-Newman-Keuls como *post hoc* teste).

4 CONCLUSÃO

A partir de todos os dados aqui expostos é possível concluir que os lipossomas contendo nimodipina apresentaram eficiente ação ansiolítica, mediada por sua interação com o sistema GABAérgico, sem apresentar comprometimento da atividade e coordenação motora dos animais. O que aponta que essa formulação lipossomal poderá futuramente ser uma boa opção terapêutica para tratamento da ansiedade. Indicando que a intervenção da

nanotecnologia farmacêutica com a utilização de lipossomas exerceu importante efeito na propagação da atividade desejada.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, A. A. C.; COSTA, J. P.; CARVALHO, R. B. F.; SOUSA, D. P.; FREITAS, R. M. Evaluation of acute toxicity of a natural compound (+)-limonene epoxide and its anxiolytic-like action. **Brain Research**, v. 1448, n. 11, p. 56-62, 2012.
- ANGRINI, M.; LESLIE, J. C.; SHEPHARD, R. A. Effects of propranolol, buspirone, pCPA, reserpine, and chlordiazepoxide on open-field behavior. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 59, n. 2, p. 387-397, 1998.
- ATAK, J. R. GABA_A Receptor $\alpha 2/\alpha 3$ Subtype-Selective Modulators as Potential Nonsedating Anxiolytics. **Current Topics in Behavioral Neurosciences**, v. 2, p. 331-360, 2010.
- BENCAN, Z.; SLEDGE, D.; LEVIN, E. D. Buspirone, chlordiazepoxide and diazepam effects in a zebrafish model of anxiety. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 94, n. 1, p. 75-80, 2009.
- BIALA, G.; KRUK, M. Calcium channel antagonists suppress cross-tolerance to the anxiogenic effects of d-amphetamine and nicotine in the mouse elevated plus maze test. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological**, v. 32, n. 1, p. 54-61, 2008.
- BOURIN, M.; DEMOULIÈRE, B.P.; NIC DHONNCHADHA, B.; HASCÖET, M. Animal models of anxiety in mice. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, v. 21, n. 6, p. 567-574, 2007.
- BRAGA, J. E. F.; PORDEUS, L. C.; SILVA, A. T. M. C.; PIMENTA, F. C. F.; DINI, M. F. F. M.; ALMEIDA, R. N. A. Ansiedade Patológica: Bases Neurais e Avanços na Abordagem Psicofarmacológica. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**, v. 14, n. 2, p. 93-100, 2010.
- CAMPELO, L. M. L.; SA, C.G.; ALMEIDA, A. A. C.; COSTA, J.P.; MARQUES, T. H.C.; FEITOSA, C.M.; SALDANHA, G.B.; FREITAS, R.M.. Sedative, anxiolytic and antidepressant activities of Citrus limon (Burn) essential oil in mice. **International Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 66, n. 8, p. 623-627, 2011.
- CASAMASSIMA, F.; HAY, F. A. C.; BENEDETTI, A.; LATTANZI, L.; CASSANO, G. B.; PERLIS, R. H.; L-Type Calcium Channels and Psychiatric Disorders: A Brief Review. **American Journal of Medical Genetics**, v. 153, p. 1373-1390, 2010.
- CHATTERJEE, M.; VERMA, R.; LAKSMI, V.; SENGUPTA, S.; VERMA, A. K.; MAHDI, A. A.; PALIT, G. Anxiolytic effects of *Plumeria rubra* var. *acutifolia* (Poiret) L. flower extracts in the elevated plus-maze model of anxiety in mice. **Asian Journal of Psychiatry**, v. 6, n. 2, p. 113-118, 2013.
- CLOOS, J. M.; FERREIRA, V. Current use of benzodiazepines in anxiety disorders. **Current Opinion in Psychiatry**, v. 22, n. 1, p. 90-95, 2009.

- CZYRAK, A.; MOGILNICKA, E.; SIWANOWICZ, J.; MAJ, J. Some behavioral effects of repeated administration of calcium channel antagonists. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 35, n. 3, p. 557-560, 1990.
- FERREIRA, P. B.; ALMEIDA, A. A. C.; FREITAS, R. M. Antioxidant effect of buspirone in epilepsy model induced by pilocarpine. **Revista de Psiquiatria Clínica**, v. 39, n. 5, p. 153-156, 2012.
- GALLAGHER, P. S.; MCKERNAN, M. G.; XIE, J.; ZINEBI, F. L-Type Voltage-Gated Calcium Channels Are Involved in the in Vivo and in Vitro Expression of Fear Conditioning. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 985, n. 1, p. 135-149, 2006.
- GOULD, T. D.; DAO, D. T.; KOVACSICS, C. E. The open field test. **Neuromethods**, v. 42, p. 1-20, 2009.
- GOMES, P. B.; NORONHA, E. C.; DE MELO, C. T. V.; BEZERRA, J. N. S.; NETO, M. A.; LINO, C. S.; VASCONCELOS, S. M. M.; VIANA, G. S. B.; DE SOUSA, F. C. F. Central effects of isolated fractions from the root of *Petiveria alliacea* L.(tipi) in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 120, n. 2, p. 209-214, 2008.
- GOMES, K. M.; SOUZA, R. P.; INÁCIO, C. G.; VALVASSORI, S. S.; RÉUS, G. Z.; MARTINS, M. R.; COMIM, C. M.; QUEVEDO, J. Evaluation of light/dark cycle in anxiety- and depressive-like behaviors after regular treatment with methylphenidate hydrochloride in rats of different ages. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 33, n. 1, p. 55-58, 2011.
- GOUVEIA JÚNIOR, A.; MORATO, S. Influências do ciclo estral sobre o desempenho de ratos no labirinto em cruz elevado; Effects of Estrous cycle on the behavior in the elevated plus maze. **Interação Psicologia**, v. 6, n. 2, p. 141-148, 2002.
- HAN, H.; MA, Y.; EUN, J. S.; LI, R.; HONG, J.-T.; LEE, M.-K.; OH, K.-W. Anxiolytic-like effects of sanjoinine A isolated from *Zizyphi Spinosi Semen*: Possible involvement of GABAergic transmission. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 92, n. 2, p. 206-213, 2009.
- HUGHES, R. N. Effects on open-field behavior of diazepam and buspirone alone and in combination with chronic caffeine. **Life sciences**, v. 53, n. 15, p. 1217-1225, 1993.
- INGRAM, D. K.; JOSEPH, J. A.; SPANGLER, E. L.; ROBERTS, D.; HENGEMIHLE, J.; FANELLI, R. J. Chronic nimodipine treatment in aged rats: analysis of motor and cognitive effects and muscarinic-induced striatal dopamine release. **Neurobiology of Aging**, v. 15, n. 1, p. 55-61, 1994.
- KAMEI, J.; MIYATA, S.; OHSAWA, M. Involvement of the benzodiazepine system in the anxiolytic-like effect of Yokukansan (Yi-gan san). **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 33, n. 8, p. 1431-1437, 2009.
- KOZLOVSKIĬ, V. L. The relationship between anticonvulsant and anti-anxiety effects of calcium channel blockers. **Eksperimental'naia i Klinicheskaia Farmakologiya**, v. 60, n. 5, p. 19, 1997.

KUDAGI, B. L.; KUMAR, R. P.; BASHA, S. K. S. Evaluation of anti-anxiety, sedative and motor co-ordination properties of ganaxolone in comparison with diazepam in rodent Models. **Journal of Dental and Medical Science**, v. 1, n. 4, p. 42-47, 2012.

KUMAR, N.; SINGH, N.; JAGGI, A. S. Anti-stress effects of cilnidipine and nimodipine in immobilization subjected mice. **Physiology & Behavior**, v. 105, n. 5, p. 1148-1155, 2011.

LALONDE, R.; STRAZIELLE, C. Relations between open-field, elevated plus-maze, and emergence tests in C57BL/6J and BALB/c mice injected with GABA- and 5HT-anxiolytic agents. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, v. 24, n. 3, p. 365-376, 2010.

LIRA, M. C. B.; SIQUEIRA-MOURA, M. P.; ROLIM-SANTOS, H. M. L.; GALETTI, F. C. S.; SIMIONI, A. R.; SANTOS, N. P.; EGITO, E. S. T.; SILVA, C. L.; TEDESCO, A. C.; SANTOS-MAGALHAES, N. S. In vitro uptake and antimycobacterial activity of liposomal usnic acid formulation. **Journal of Liposomes Research**, v.9, p.49-58, 2009.

MACHADO, R. A.; ROMERO, E. B.; ASTENCIO, A. M. G.; SANTOS, A. S.; CUARTAS, V. B.; LÓPEZ, M. M. Prospective Randomized Controlled Trial of Nimodipine as Add-On Therapy in the Treatment of Focal Refractory Epilepsy Patients: A Pilot Study. **Journal of Neurology & Neurophysiology**, v.4, n. 151, 2013.

MAGALHÃES, N.S.S; MOSQUEIRA, V. C. F. Nanotechnology applied to the treatment of malaria. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 62, n. 4, p. 560-575, 2010.

MARINO, V.; PISANTI, N.; CAPONE, D. Effects of nimodipine on psychological-stress situation in aged rats. **Acta Neurologica**, v. 5, n. 5, p.410-417, 1991.

MARQUES, T. H. C.; MELO, C. H. S. D.; FREITAS, R. M. D. In vitro evaluation of antioxidant, anxiolytic and antidepressant-like effects of the *Bellis perennis* extract. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 22, n. 5, p. 1044-1052, 2012.

MASUR, J.; MARTZ, R.M.W.; CARLINI, E.A. Effects of acute and chronic administration of *Cannabis sativa* and (-) α 9-trans-tetrahydrocannabinol on the behavior of rats in an open field arena. **Psychopharmacology**, v. 19, n. 4, p. 338-397, 1971.

MÖHLER, H. The GABA system in anxiety and depression and its therapeutic potential. **Neuropharmacology**, v. 62, n. 1, p. 42-53, 2012.

MULULO, S.C.C.; MENEZES, G.B.; VIGNE, P.; FONTENELLE, L.F. A review on predictors of treatment outcome in social anxiety disorder. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 34, n. 1, p. 92-100, 2012.

OHYAMA, T.; SATO, K.; KISHIMOTO, K.; YAMAZAKI, Y.; HORIGUCHI, N.; ICHIKAWA, T.; KAKIZAKI, S.; TAKAGI, H.; IZUMI, T.; MORI, M. Azelnidipine is a calcium blocker that attenuates liver fibrosis and may increase antioxidant defence. **British Journal of Pharmacology**, v. 165, n. 4, p. 1173-1187, 2012.

OLATUNJI, B. O.; CISLER, J. M.; DEACON, B. J. Efficacy of cognitive behavioral therapy for anxiety disorders: a review of meta-analytic findings. **Psychiatric Clinics of North America**, v. 33, n. 3, p. 557-577, 2010.

PULTRINI, A.M.; GALINDO, L.A.; COSTA, M. Effects of the essential oil from *Citrus aurantium* L. in experimental anxiety models in mice. **Life Sciences**, v. 78, n. 15, p. 1720-1725, 2006.

RAUPP, I. M.; SERENIKI, A.; VIRTUOSO, S.; GHISLANDI, C.; CAVALCANTI, S. E. L.; TREBIEN, H. A.; MIGUEL, O. G.; ANDREATINI, R. Anxiolytic-like effect of chronic treatment with *Erythrina velutina* extract in the elevated plus-maze test. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 118, n. 2, p. 295-299, 2008.

RIBEIRO, C.A.S. **Bateria sequencial de procedimentos para avaliação da atividade ansiolítica e antidepressiva em camundongo**. 2010. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2010.

RICCI, E. L.; FERREIRA JÚNIOR, V.; HABR, S. F.; MACRINI, D. J.; BERNARDI, M. M.; SPINOSA, H. S. Behavioral and neurochemical evidence of deltamethrin anxiogenic-like effects in rats. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 50, n. 1, p. 33-42, 2013.

RUDOLPH, U.; KNOFLACH, F. Beyond classical benzodiazepines: novel therapeutic potential of GABAA receptor subtypes. **Nature Reviews Drug Discovery**, v.10, p. 685-697, 2011.

SERAFIM, A. P.; FELICIO, L. F. Dopaminergic modulation of grooming behavior in virgin and pregnant rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 34, n. 11, p. 1465-1470, 2001.

SILVA, A. P. D. S.; CERQUEIRA, G. S.; NUNES, L. C. C.; FREITAS, R. M. Effects of an aqueous extract of *Orbignya phalerata* Mart on locomotor activity and motor coordination in mice and as antioxidant in vitro. **International Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 67, n. 3, p. 260-263, 2012.

SOUSA, F. C. F.; MELO, C. T. V.; CITÓ, M. C. O.; FÉLIX, F. H. C.; VASCONCELOS, S. M. M.; FONTELES, M. M. F.; BARBOSA-FILHO, J. M.; VIANA, G. S. B. Plantas medicinais e seus constituintes bioativos: Uma revisão da bioatividade e potenciais benefícios nos distúrbios da ansiedade em modelos animais. **Revista Brasileira Farmacognosia**, v. 18, p. 642-654, 2008.

SOUTO-MAIOR, F. N.; CARVALHO, F. L. D.; MORAIS, L. C. S. L. D.; NETTO, S. M.; DE SOUSA, D. P.; ALMEIDA, R. N. D. Anxiolytic-like effects of inhaled linalool oxide in experimental mouse anxiety models. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 100, n. 2, p. 259-263, 2011.

SUN, C.; WANG, J.; LIU, J.; QIU, L.; ZHANG, W.; ZHANG, L. Liquid Proliposomes of Nimodipine Drug Delivery System: Preparation, Characterization, and Pharmacokinetics. **AAPS PharmSciTech**, v. 14, n. 1, p. 332-338, 2013.

TALAREK, S.; ORZELSKA, J.; LISTOS, J.; FIDECKA, S. Effects of sildenafil treatment on the development of tolerance to diazepam-induced motor impairment and sedation in mice. **Pharmacological Reports**, v. 62, n. 627, p. 627-634, 2010.

UEMAETOMARI, I.; TABUCHI, K.; NAKAMAGOE, M.; TANAKA, S.; MURASHITA, H.; HARA, A. L-type voltage-gated calcium channel is involved in the pathogenesis of acoustic injury in the cochlea. **The Tohoku Journal of Experimental Medicine**, v. 218, n. 1, p. 41-47, 2009.

WANG, Z.; DENG, Y.; ZHANG, X.; WANG, T.; WU, F. Development and pharmacokinetics of nimodipine-loaded liposomes. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 58, n. 9, p. 1289-1294, 2006.

YAMADA, T.; YAMADA, Y.; OKANO, Y.; TERASHIMA, T.; YOKOGOSHI, H. Anxiolytic effects of short-and long-term administration of cacao mass on rat elevated T-maze test. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 20, n. 12, p. 948-955, 2009.

YANPALLEWAR, S. U.; HOTA, D.; RAI, S.; KUMAR, M.; ACHARYA, S. B. Nimodipine attenuates biochemical, behavioral and histopathological alterations induced by acute transient and long-term bilateral common carotid occlusion in rats. **Pharmacological Research**, v. 49, n. 2, p. 143-150, 2004.

ZANETTINI, V. C.; LACONO, L. L.; MOLES, A.; GROSS, C.; D'AMATO, F. R. Postnatal handling reverses social anxiety in serotonin receptor 1A knockout mice. **Gene, Brain and Behavior**, v. 9, n. 1, p. 26-32, 2010.

ZUO, X. C.; ZHANG, B. K.; JIA, S. J.; LIU, S. K.; ZHOU, L. Y.; LI, J.; ZHANG, J.; DAI, L. L.; CHEN, B. M.; YANG, G. P.; YUAN, H. Effects of Ginkgo biloba extracts on diazepam metabolism: a pharmacokinetic study in healthy Chinese male subjects. **European Journal of Clinical Pharmacology**, v. 66, p. 503-509.

CAPÍTULO III: Avaliação do potencial antioxidante *in vitro* de uma
formulação lipossomal contendo nimodipina

Avaliação do potencial antioxidante *in vitro* de uma formulação lipossomal contendo nimodipina

**OLIVEIRA, G.Z.S.¹; SILVA, O.A.¹; ALMEIDA, V.P.A.³; MORENO, L.C.G.A.I.²;
MAGALHÃES, N.S.S.²; FREITAS, R.M.¹; ROLIM, H.M.L.¹.**

¹Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Piauí, Teresina, Piauí, Brasil.

²Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil.

³Curso de Farmácia da Universidade Federal do Piauí, Teresina, Piauí, Brasil.

RESUMO

A manutenção do equilíbrio entre a produção de radicais livres e as defesas antioxidantes é uma condição essencial para o funcionamento normal do organismo. Os agentes antioxidantes podem prevenir ou diminuir os danos oxidativos nos tecidos humanos. Dessa forma, este estudo teve como objetivo avaliar o potencial antioxidante *in vitro* da nimodipina e de lipossomas contendo nimodipina (LCNa) em proteger contra a ocorrência de peroxidação lipídica, remover os radicais hidroxilas e reduzir a produção do íon nitrito, bem como determinar a concentração efetiva inibitória (CE₅₀) capaz de remover 50% desses radicais. Para determinação da peroxidação lipídica foi quantificado o conteúdo de espécies reativas com o ácido tiobarbitúrico, enquanto que a produção do radical hidroxila foi averiguada por meio da Reação de Fenton, na qual este radical livre foi produzido pela degradação oxidativa da 2-desoxirribose. Já o óxido nítrico (NO) foi gerado a partir da decomposição espontânea do nitroprussiato de sódio. Uma vez gerado NO, ele interage com o oxigênio para produzir íons nitrito, que foram medidas pela reação de Griess. Os resultados obtidos foram expressos como média ± erro padrão da média (E.P.M.) e a significância estatística foi determinada utilizando Análise de Variância (ANOVA) seguida pelo teste de *t*-Student-Newman-Keuls como *post hoc* teste. Os valores foram considerados significativos quando apresentaram $p < 0,05$. Dessa forma, foi verificado que todas as concentrações de LCNa foram capazes de prevenir a formação de íons nitritos e de remover as substâncias reativas com ácido tiobarbitúrico de forma mais eficiente que a nimodipina livre. Porém na avaliação da remoção dos radicais hidroxilas foi visto que a nimodipina isolada apresentou melhor efeito do que a sua forma lipossomal. Os resultados dos testes antioxidantes demonstraram também concentrações efetivas inibitórias da nimodipina livre de 0,08, 0,10 e 0,16 µg/mL que foram capazes de

reduzir em 50% a presença de radicais nitritos, de radicais hidroxilas e de espécies reativas com ácido tiobarbitúrico, respectivamente. Enquanto que os LCNa apresentaram CE_{50} de 0,06, 0,46 e 0,12 $\mu\text{g/mL}$ correspondentes aos mesmos radicais livres. Portanto, todos esses resultados sugerem um positivo potencial antioxidante dos LCNa, apontando essa formulação como um eficiente protetor *in vitro* das biomoléculas, como lipídios das membranas celulares. No entanto, há a necessidade da avaliação da atividade antioxidante *in vivo* para poder comprovar a eficiência do referido efeito, no intuito de futuramente poder se vislumbrar sua aplicação no tratamento de diversas doenças que estejam envolvidas com processos oxidativos, como as que acometem o sistema nervoso central.

PALAVRAS-CHAVE: Lipossomas; Nimodipina; Nitrito; Peroxidação Lipídica; Radical Hidroxila.

Abstract: Evaluation of antioxidant activity *in vitro* in a liposome formulation containing nimodipine

Maintaining balance between the production of free radicals and antioxidant defenses is a prerequisite for normal body functioning. The antioxidants can prevent or reduce oxidative damage in human tissues. Thus, this study aimed at evaluating the *in vitro* antioxidant potential of nimodipine and liposomes containing nimodipine (LCNa) to protect against the occurrence of lipid peroxidation, to remove the hydroxyl radicals and reduce the production of nitrite ion, as well as determining the effective inhibitory concentration (EC_{50}) capable of removing 50% of these radicals. The content of reactive species with thiobarbituric acid was quantified to determine the lipid peroxidation, while the production of the hydroxyl radical was determined by the Fenton Reaction, in which the free radical is produced by oxidative degradation of 2-deoxyribose. The nitric oxide (NO) was generated from the spontaneous decomposition of sodium nitroprusside. Once generated, the NO interacts with oxygen to produce nitrite ions, which were measured by Griess reaction. The results were expressed as mean \pm standard error of the mean (SEM) and the statistical significance was determined using analysis of variance (ANOVA) followed by t-Student-Newman-Keuls as *post hoc* test. Values were considered significant when $p < 0.05$. Thus, all concentrations of LCNa were able to prevent the formation of nitrite ions and remove reactive substances with thiobarbituric acid more efficiently than nimodipine. However, the isolated nimodipine had better effect than then liposomal form when evaluating the hydroxyl radicals' removal. The test results with antioxidants also demonstrated that the effective inhibitory concentrations of nimodipine of 0.08, 0.10 and 0.16 $\mu\text{g/mL}$ were able to reduce by 50% the presence of nitrite radicals, hydroxyl radicals and reactive species with thiobarbituric acid, respectively. While

the LCNa showed EC₅₀ of 0.06, 0.46 and 0.12 µg/mL corresponding to the same radicals. Therefore, all these results suggest a positive antioxidant potential of LCNa, indicating that formulation as an effective *in vitro* protector of biomolecules, such as lipids of cell membranes. However, there is a need for evaluating the antioxidant activity *in vivo* in order to prove the efficiency of this effect to be able to envision its future application in the treatment of several diseases involved with oxidative processes, such as those affecting the central nervous system.

KEYWORDS: Hydroxyl Radical; Lipid Peroxidation; Liposomes; Nimodipine; Nitrites.

1INTRODUÇÃO

A manutenção do equilíbrio entre a produção de radicais livres (RLs) e as defesas antioxidantes é uma condição essencial para o funcionamento normal do corpo. Quando este equilíbrio inclina para a produção de radicais livres pode ser descrito que o organismo se encontra em estresse oxidativo. Esse fenômeno pode ocorrer após a exposição prolongada a agentes oxidantes, como os RLs, ou pela diminuição da capacidade antioxidante desse sistema. Conceitualmente, radicais livres são átomos ou moléculas que possuem um ou mais elétrons não pareado no orbital externo, dando-lhe uma configuração espacial que gera elevada instabilidade (BARBOSA et al., 2010).

Comumente esses radicais derivam de oxigênio, nitrogênio e enxofre, criando assim, espécies reativas derivadas de oxigênio (EROS), de nitrogênio (ERNS) e de enxofre (ERSS). As espécies reativas de oxigênio podem ser divididas em radicalares como ânions superóxidos (O₂⁻), peroxilas (ROO•), hidroxilas (OH•) e alcóxilas (RO•), bem como as não-radicalares a exemplo do oxigênio, peróxido de hidrogênio e ácido hipocloroso. Já as ERNS são representadas pelo óxido nítrico (NO), óxido nitroso (N₂O), ácido nitroso (HNO₂), nitritos (NO₂⁻), nitratos (NO₃⁻) e peroxinitritos (ONOO⁻). Enquanto as espécies reativas de enxofre são formadas facilmente pela reação dos EROS com os tióis (CAROCHO; FERREIRA, 2012).

Esses elementos são constantemente formados em processos biológicos, porém quando estão presentes em excesso podem participar do desenvolvimento de efeitos danosos ao organismo, como é o caso da peroxidação dos lipídios das membranas celulares e dos ataques aos carboidratos, ácidos nucleicos, enzimas e proteínas teciduais (PINHO et al., 2010). Podendo inclusive desencadear efeitos letais às células, além de estarem frequentemente envolvidas em diversas patologias, como as que acometem o cérebro (ALAM; BRISTI; RAFIQUZZAMAN, 2012).

No entanto, as exposições aos RLs fazem com que o organismo desenvolva uma série de mecanismos de defesa para eliminá-los, podendo dessa maneira prevenir ou mesmo diminuir os danos oxidativos, como é o caso da atuação dos agentes antioxidantes (FORTES et al., 2013; NUNES et al., 2013). É entendido por antioxidantes todos os compostos químicos que exercem o papel preventivo, inibitório ou ao menos minimizador de danos oxidativos em lipídios, proteínas e ácidos nucléicos produzidos por excesso de radicais livres e compostos oxidantes, de modo a reagir com estes para reduzir os efeitos prejudiciais ao organismo (MORAIS et al., 2009; COUTO; BRAZACA, 2010).

Existem inúmeras substâncias de origens naturais e medicamentosas que possuem consagrado efeito antioxidante. Porém, por vezes, essas substâncias apresentam algumas limitações nas suas propriedades farmacocinética e farmacodinâmica que dificultam a expressão desse efeito terapêutico, como é o caso da baixa disponibilidade oral, da insolubilidade aquosa e do elevado mecanismo de primeira passagem (MANDAL et al., 2008; PENG, et al., 2010; ZHAO et al., 2011).

Por isso, o desenvolvimento de sistemas farmacêuticos que melhorarem a distribuição e interação desses compostos no organismo constitui uma forte tendência da tecnologia farmacêutica. Um das opções para essa finalidade é a vetorização de substâncias utilizando lipossomas, por esses serem vesículas lipídicas com características únicas que os tornam veículos seguros e eficazes para o transporte de substâncias direcionadas para tratamento de diversas patologias, como as que envolvem processos oxidativos. Além desses nanossistemas serem os únicos autorizados para aplicação clínica (OLIVEIRA et al., 2012).

Dessa forma, vários estudos estão sendo realizados para demonstrar o potencial antioxidante de formulações lipossomais, na encapsulação de medicamentos ou substâncias naturais, para posteriormente analisar seu potencial antioxidante em patologias relacionadas ao estresse oxidativo, de modo a descobrir uma nova indicação terapêutica para essas substâncias (RIVERA et al., 2008; KIZELSZTEIN et al., 2009).

Nesse sentido, esse estudo teve como objetivo avaliar o potencial antioxidante *in vitro* da nimodipina e de lipossomas contendo nimodipina (LCNa) em impedir a ocorrência de peroxidação lipídica, remover os radicais hidroxilas e reduzir a produção de nitrito, bem como elucidar o possível mecanismo envolvido na atividade antioxidante dos compostos, além de determinar a concentração efetiva inibitória (CE_{50}) capaz de remover 50% desses radicais e analisar a regressão linear dos testes antioxidantes envolvidos nesse estudo.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Preparação das soluções de nimodipina e da formulação lipossomal de nimodipina (LCNa)

Para preparação das soluções de nimodipina foi utilizada solução salina 0,9% (veículo) para obtenção das concentrações de 0,9, 1,8, 3,6, 5,4 e 7,2 µg/mL.

Já os lipossomas contendo nimodipina (LCNa) foram preparados utilizando o método de hidratação do filme lipídico (LIRA et al., 2009). Os lipossomas foram produzidos sem carga, utilizando como lipídios a fosfatidilcolina de soja e o colesterol (proporção de 8:2), além de 0,010 g de nimodipina para a obtenção de uma formulação lipossomal com concentração lipídica de 117,6 mM e concentração do fármaco de 1,0 mg/mL. Esses constituintes foram solubilizados em uma mistura de clorofórmio: metanol (3:1 v/v), sob agitação magnética. Os solventes foram removidos por evaporação à vácuo, utilizando o rotaevaporador por 60 min (37 ± 1 ° C, 80 rpm), resultando na formação de um filme lipídico. Este filme foi hidratado com 10 mL de solução tampão fosfato pH 7,4 produzindo assim vesículas multilamelares grandes. Por fim, a suspensão lipossomal foi submetida à sonicação por sonda ultrassônica (Vibra Cell, BRANSON, EUA) a 200 W e 40 Hz por 300 s para a obtenção de lipossomas unilamelares pequenos. Na realização desse teste foram utilizados os lipossomas nas concentrações de 0,9, 1,8, 3,6, 5,4 7,2 µg/mL, utilizando solução tampão fosfato pH 7,4 como meio diluente.

Para comparação da atividade antioxidante nos testes desse estudo foi utilizado trolox 140 µg/mL como droga antioxidante padrão, além de cada teste ter um controle composto pelo veículo de cada substância e outro contendo somente o sistema reacional de cada ensaio.

2.2 Avaliação do potencial antioxidante *in vitro* da nimodipina e de LCNa contra a produção de radicais nitríto (NO_2^-)

Nesse ensaio, o óxido nítrico (NO) foi gerado a partir da decomposição espontânea do nitroprussiato de sódio (NPS). Uma vez gerado NO, ele interage com o oxigênio para produzir íons nitrito, os quais foram medidos pela reação de Griess (NOGUEIRA NETO; SOUSA; FREITAS, 2013). A mistura reacional contendo 1 mL de nitroprussiato de sódio e as substâncias utilizadas nesses experimentos (LCNa e Nimodipina) em diferentes concentrações foram incubados a 37 °C durante 1h. Após esse período, uma alíquota de 0,5 mL foi retirada dessa mistura e em seguida homogeneizada com 0,5 mL do Reagente de Griess. Posteriormente, a absorbância do cromóforo foi medida a 540 nm. Os resultados do potencial inibitório foram expressos em porcentagem de nitrito formado por NPS sozinho.

2.3 Avaliação do potencial antioxidante *in vitro* da nimodipina e do LCNa na remoção de radicais hidroxila (OH•)

A formação do radical hidroxila (OH•), mediante a Reação de Fenton, foi quantificada por meio da degradação oxidativa de 2-desoxirribose a malonaldeído (MDA), que por sua vez reage com o ácido tiobarbitúrico (TBA) (MARQUES; MELO; FREITAS, 2012). As reações foram iniciadas pela adição de sulfato ferroso (FeSO_4) a 6 mM em soluções contendo 5 mM de 2-desoxirribose, 100 mM de H_2O_2 , 20 mM de tampão fosfato (pH 7,2) e diferentes concentrações de nimodipina e LCN. Após 15 minutos à temperatura ambiente, foi adicionado ácido fosfórico 4% (v/v) para cessar a reação, seguido de TBA 1% (p/v, em NaOH 50 mM). As soluções foram aquecidas durante 15 min a 95 °C, e depois resfriadas à temperatura ambiente. Por fim, a absorbância foi medida a 532 nm e os resultados foram expressos em função da degradação da 2-desoxirribose.

2.4 Avaliação do potencial antioxidante *in vitro* da nimodipina e de LCNa na remoção de substâncias reativas com ácido tiobarbitúrico (TBARS)

A determinação do conteúdo de espécies reativas com ácido tiobarbitúrico (TBARS) foi realizada para quantificar o nível de peroxidação lipídica, e para isto utilizou-se de gema de ovo homogeneizado como substrato rico em lipídios (SILVA et al., 2012).

Brevemente, a gema de ovo foi homogeneizada (1%, w/v) em tampão fosfato 20 mM (pH 7,4). Deste homogenato, 1 mL foi misturado com nimodipina ou LCNa nas concentrações testadas. A peroxidação lipídica foi induzida pela adição de 0,1 mL de solução de AAPH (2,2'-azobis 2- amidinopropano) a 0,12 M. As reações foram realizadas durante 30 min a 37 °C. Após o resfriamento, as amostras (0,5 mL) foram centrifugadas com 0,5 mL de ácido tricloroacético (15%) a 1200 rpm durante 10 min. Uma alíquota de 0,5 mL do sobrenadante foi misturada com 0,5 mL de ácido tiobarbitúrico (0,67%) e aquecida a 95 °C durante 30 min. Após o resfriamento, foram medidas as absorbâncias a 532 nm, os resultados foram expressos em porcentagem de TBARS formadas por AAPH sozinho (controle induzido).

2.5 Análise Estatística

Os dados obtidos foram analisados com o *Software GraphPad Prism*® versão 5.0 e apresentados como a média \pm erro padrão da média (E.P.M.). Os resultados foram avaliados por meio da Análise de Variância (ANOVA) seguido pelo teste *t*-Student-Newman-Keuls *compost hoc* teste. As diferenças encontradas foram consideradas estatisticamente

significativas quando $p < 0,05$. A porcentagem de redução dos radicais livres (R%) foi determinada em função das medidas das absorbâncias por meio da seguinte equação (REANMONGKOL et al., 1994):

$$R\% = 100 \times (Ac - AT) / Ac$$

onde, a Ac é a absorbância do controle, obtida do meio reacional sem a amostra e AT é o valor de absorbância da substância testada.

A concentração efetiva inibitória de 50% (CE₅₀) representa a concentração de uma determinada substância que é capaz de remover 50% dos radicais livres formados, nesses testes os valores da CE₅₀ e seus intervalos de confiança de 95% foram obtidos por regressão não linear utilizando o programa *GraphPad Prism*®.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Caracterização da formulação

Os lipossomas contendo nimodipina (LCNa) utilizados na realização dos testes antioxidantes apresentam a seguinte caracterização físico-química: tamanho de partícula de $107,17 \pm 1,53$ nm, índice de polidispersão $0,303 \pm 0,002$ nm, potencial zeta $-5,32 \pm 1,29$ mV, pH 7,4, teor de fármaco de $99 \pm 0,21\%$ e taxa de encapsulação de $99 \pm 0,21\%$. Indicando que os LCNa se classificam como lipossomas unilamelares pequenos (SUV), com tamanho, homogeneidade e carga de superfície favoráveis para utilização em testes *in vivo*, além de apresentar alto rendimento, elevada taxa de fármaco encapsulado e manutenção da estabilidade da formulação por um período de 15 dias sem alterar suas características micro e macroscópicas.

3.2 Potencial antioxidante *in vitro* da nimodipina e de lipossomas contendo nimodipina

O processo de formação do nitrito envolve inicialmente a metabolização do óxido nítrico (NO), por esse ser um gás instável é rapidamente convertido em dois produtos estáveis, nitrito (NO₂⁻) e nitrato (NO₃⁻), que em presença de oxigênio produzem peroxinitritos (ONOO⁻), elementos com elevado potencial citotóxico e pró-inflamatório (VASCONCELOS et al., 2007; QUINTANS JÚNIOR et al., 2011). Nesse teste foi avaliado o potencial antioxidante *in vitro* das substâncias envolvidas por meio do potencial que elas apresentam de impedir a produção de nitrito pela metabolização do óxido nítrico (SILVA et al., 2012).

Desse modo, foi verificado que a nimodipina apresentou resultados significativos quanto a inibição da produção de íons nitrito, com as concentrações de 0,9 µg/mL, 1,8 µg/mL, 3,6 µg/mL, 5,4 µg/mL e 7,2 µg/mL promovendo reduções de 56,73%, 69,32%,

72,83%, 76,67% e 83,90%, respectivamente, com relação ao nitroprussiato de sódio. Enquanto que o trolox (140 µg/mL) reduziu a produção desse radical em apenas 59,76%, demonstrando potencial antioxidante melhor apenas do que a menor concentração da nimodipina ($p < 0,05$) (**Figura 1**). Segundo Ferreira e colaboradores (2012) o trolox (ácido 6-hidroxi-2, 5, 7,8 tetrametilcromano-2-carboxílico) é utilizado como droga antioxidante padrão para experimentos *in vitro* e possui características semelhantes a vitamina E (α -tocoferol). Foi visto também que é necessária uma concentração de 0,08 µg/mL de nimodipina para reduzir 50% da produção de íons nitrito, com variação de 0,04 a 0,13 µg/mL e intervalo de confiança de 99,8%.

Corroborando com esses resultados, existem dados na literatura que indicam que a nimodipina apresenta potencial antioxidante quando administrada em pacientes com traumatismo craniano grave, prevenindo o estresse oxidativo e aumentando as defesas antioxidantes endógenas nesses pacientes (ASLAN et al., 2012). Em concordância, foi evidenciado que esse efeito se estende a outros bloqueadores dos canais de cálcio como a azelnidipina e amlodipina, quando administrados em ratos após o procedimento de isquemia focal transiente (PANIN et al., 2007). Da mesma forma, a cilnidipina também demonstrou atividade antioxidante, propondo uma nova visão para a aplicação dos bloqueadores dos canais de cálcio (HIROOKA; SUNAGAWA, 2010).

Já com os resultados dos lipossomas contendo nimodipina foi possível constatar que o crescimento do potencial antioxidante do LCNa está associado ao aumento de suas concentrações. De modo que as mesmas concentrações utilizadas para nimodipina promoveram redução de nitrito em 79,95%, 81,69%, 82,71%, 83,34% e 83,90%, respectivamente, com relação ao nitroprussiato de sódio ($p < 0,05$), revelando considerável potencial para proteger as biomoléculas, como os lipídios de membrana, contra os danos produzidos por essa espécie reativa derivada do nitrogênio (**Figura 2**).

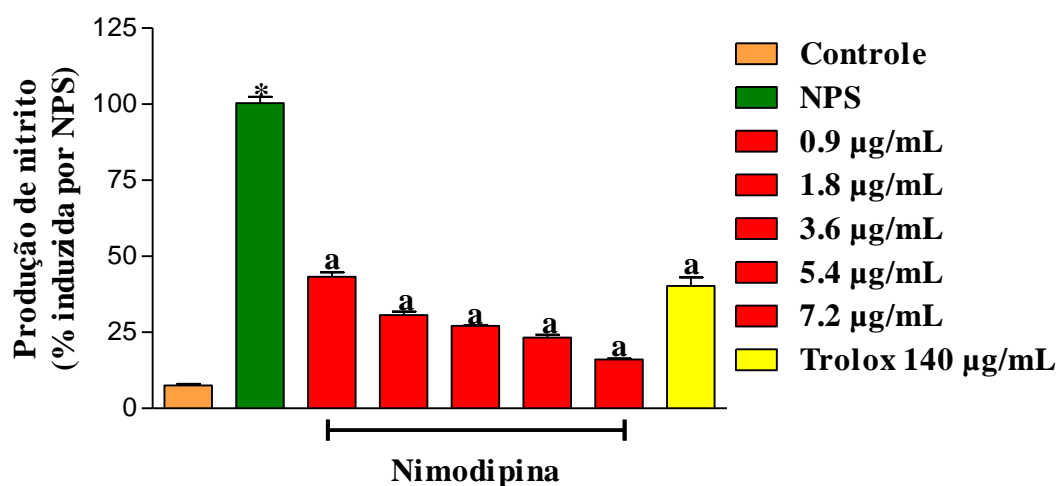
Foi evidenciado também que todas as concentrações testadas promoveram redução de nitrito superior ao Trolox (140 µg/mL), que por sua vez produziu redução de nitrito em 59,76%. No entanto, foi verificado que os lipossomas precisaram de uma concentração para inibir 50% da produção de nitrito menor que a da nimodipina (0,08 µg/ml), assumindo assim uma CE_{50} de 0,06 µg/ml variando de 0,03 a 0,12 µg/ml, com intervalo de confiança de 99% ($p < 0,05$).

Esses resultados demonstram que os lipossomas de nimodipina apresentam melhor potencial antioxidante que a nimodipina isolada, com exceção da maior concentração que apresentou igual potencial antioxidante, fato que é muito positivo uma vez nos LCNa foram utilizada uma quantidade de nimodipina 87 vezes menor que as respectivas soluções de

nimodipina, já que em 1mg de LCNa, formado por fosfatidicolina, colesterol e nimodipina, contém apenas 0,01151 mg de nimodipina.

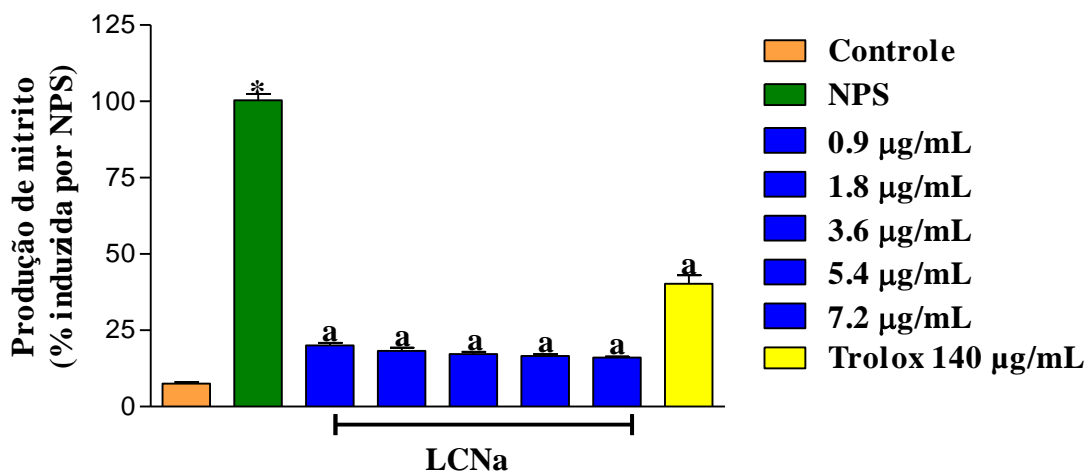
Com isso pode ser dito que essa formulação indica promissora ação sequestradora de NO, impedindo sua associação com o oxigênio para formar radicais nitritos. Essa redução da produção de nitrito ajuda no tratamento de doenças neurodegenerativas de forma neuroprotetora, pelo fato dos níveis de nitrito e nitrato também estarem envolvidos em processos neuronais podendo propiciar efeitos excitotóxicos no sistema nervoso central, causando lesões cerebrais além de ativar e proliferar os efeitos neurodegenerativos (AHMADI et al., 2011; SERAFINI et al., 2011; FERREIRA; ALMEIDA; FREITAS, 2012).

Figura 1: Potencial antioxidante *in vitro* da nimodipina contra a formação do radical nitrito (NO_2^-)



Os valores representam a média \pm E.P.M. dos experimentos realizados em duplicata ($n = 5$).
^a $p < 0,05$ versus nitroprussiato de sódio; * $p < 0,05$ versus controle (ANOVA seguido do teste *t*-Student-Neuman-Keuls como *post hoc* teste).

Figura 2: Potencial antioxidante *in vitro* da formulação lipossomal contendo nimodipina contra a formação do radical nitrito (NO_2^-)



Os valores representam a média \pm E.P.M. dos experimentos realizados em duplicata ($n = 5$).
^a $p < 0,05$ versus nitroprussiato de sódio; * $p < 0,05$ versus controle (ANOVA seguido do teste *t*-Student-Neuman-Keuls como *post hoc* teste).

Complementando esse estudo foi avaliado o potencial antioxidante *in vitro* das diferentes concentrações das substâncias testadas na remoção de radicais hidroxilas. Esses radicais possuem $T_{1/2}$ muito curto, o que dificulta o seu processo de remoção *in vivo*, além de serem considerados os mais reativos e com maior potencial danoso para o organismo, uma vez que o corpo não apresenta mecanismos de defesa contra eles. Os radicais hidroxilas possuem como agravante o fato de poderem reagir com endobióticos, alterar as proteínas e os aminoácidos, inativar as enzimas, modificar a estrutura do DNA em relação às suas bases e comprometer a integridade de suas fitas podendo provocar mutações e apoptoses, bem como promover a peroxidação lipídica nas membranas celulares nucleolares e mitocondriais, de modo a produzir novos radicais livres que podem causar danos a essas moléculas (BARBOSA et al., 2010).

Tendo em vista os motivos apresentados, a remoção desses radicais representa uma importante ação benéfica para o organismo, de modo que substâncias que apresentam essa capacidade possuem relevante potencial antioxidante podendo desempenhar ação reparatória dos danos produzidos e/ou inibitória da formação das EROS (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006).

Como é o caso da nimodipina, na qual os resultados obtidos com relação à remoção dos radicais hidroxilas corroboraram com os bons resultados do teste do nitrito, com as concentrações de 0,9 µg/mL, 1,8 µg/mL, 3,6 µg/mL, 5,4 µg/mL e 7,2 µg/mL promovendo remoção dos radicais hidroxilas em 76,47%, 77,26%, 77,66%, 77,91% e 77,52%, com relação ao sistema reacional ($p < 0,05$) (Figura 3).

Embora esses resultados antioxidantes sejam positivos, as concentrações de nimodipina exibiram potencial de sequestro de radicais hidroxilas um pouco abaixo do promovido pelo trolox (140 µg/mL) que demonstrou redução em 78,06% desses radicais. Porém é importante ressaltar que a concentração do trolox foi muito superior às concentrações da nimodipina utilizadas, cerca de 20 vezes maior do que a maior concentração de nimodina testada (7,2 µg/mL). Já a concentração efetiva inibitória (CE₅₀) da nimodipina necessária para remover 50% dos radicais hidroxilas foi determinada como 0,10 µg/mL variando de 0,48 a 0,23 µg/mL, com intervalo de confiança de 97%.

Esse potencial antioxidante pode ser visto em outros antagonistas dos canais de cálcio, como é o caso da azelnidipina que apresentou efeito antioxidante em cultura de células do endotélio arterial que foram expostas ao estresse oxidativo proporcionado por H₂O₂ (SHINOMIYA et al., 2004). No mesmo sentido, a utilização da felodipina (5 mg), amlodipina (10 mg) e lercanidipina (10 mg) em pacientes com hipertensão arterial proporcionou a diminuição dos hidroperóxidos, dos radicais livres e de produtos finais de peroxidação, além de elevar a capacidade antioxidante total no plasma, atestando a importante utilização desses bloqueadores de cálcio no tratamento da hipertensão, pelo fato deles diminuírem o estresse oxidativo e regularem a pressão arterial (DIGIESI et al., 2000).

Quanto aos lipossomas de nimodipina, a avaliação da remoção dos radicais hidroxilas demonstrou relação linear negativa entre os fatores, com a diminuição do percentual de radicais hidroxilas à medida que aumentam as concentrações dos lipossomas, com remoção dos radicais hidroxila em 28,48%, 40,69%, 42,72%, 49,04% e 52,71%, em relação as mesmas concentrações utilizadas anteriormente, quando comparado ao sistema reacional. Enquanto que o trolox (140 µg/mL) promoveu uma remoção de 78,06% dos radicais hidroxilas (p<0,05) (**Figura 4**).

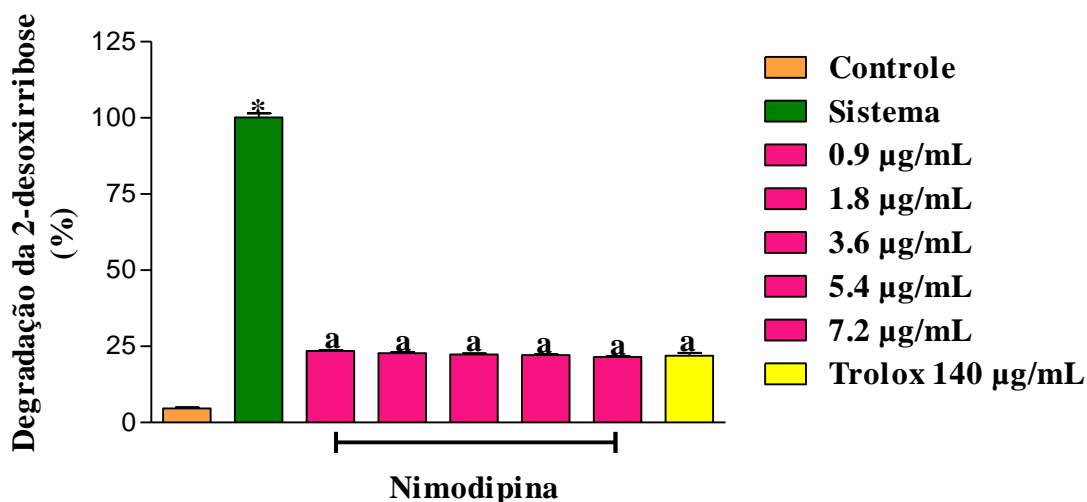
Foi percebido também que os LCNa apresentaram uma CE₅₀ de 0,46 µg/mL para o íon hidroxila variando de 0,32 a 0,67 µg/mL, com intervalo de confiança de 98%, sugerindo que é necessário uma concentração maior de formulação em relação a nimodipina (0,10 µg/mL), para remover 50% dos radicais hidroxilas.

Com esses resultados pode ser inferido que a nimodipina nas concentrações testadas apresentou maior potencial de remover os radicais hidroxilas do que os LCNa. Essa hipótese é reforçada pela elucidação do provável mecanismo de reação, explicado mais adiante, que envolve a nimodipina liberada do lipossomacom sua interação com o meio reacional e com os próprios lipídios do lipossoma.

Os lipossomas peguilados de tempamina, um tipo de nitróxido de piperidina estável, foram outro lipossoma que demonstraram importante efeito antioxidante, por promover a

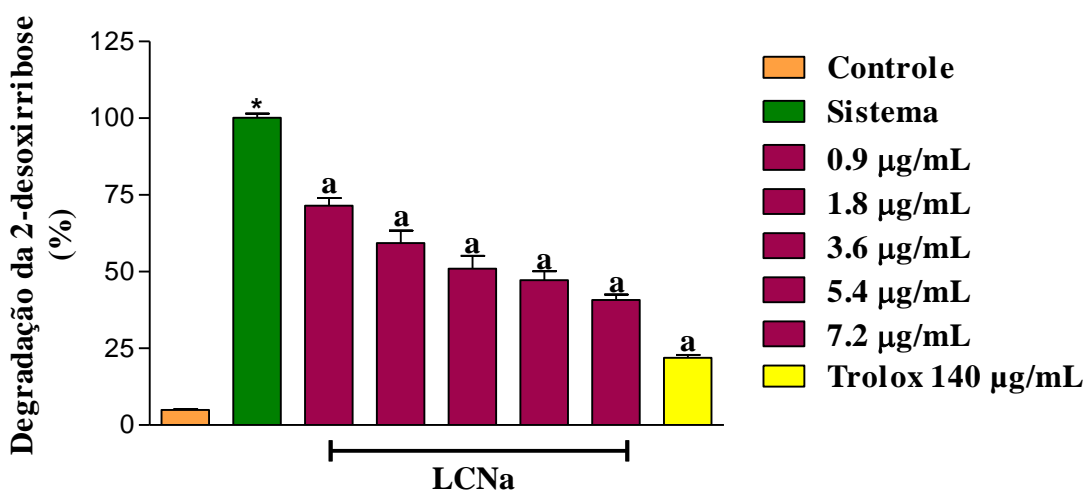
liberação lenta e controlada desse composto que alcançou a circulação cerebral de ratos, proporcionando significativos efeitos terapêuticos para o tratamento de encefalomielite autoimune experimental, pelo fato da tempamina ser capaz de reverter o dano oxidativo proveniente de EROS (KIZELSZTEIN et al., 2009).

Figura 3: Potencial antioxidante *in vitro* da nimodipina na remoção de radicais hidroxilas



Os valores representam a média \pm E.P.M. dos experimentos realizados em duplicata (n = 5).
^ap<0,05 *versus* sistema reacional; * p<0,05 *versus* controle (ANOVA seguido do teste *t*-Student-Neuman-Keuls como *post hoc* teste).

Figura 4: Potencial antioxidante *in vitro* da formulação lipossomal contendo nimodipina na remoção de radicais hidroxilas



Os valores representam a média \pm E.P.M. dos experimentos realizados em duplicata (n = 5).
^ap<0,05 *versus* sistema reacional; * p<0,05 *versus* controle (ANOVA seguido do teste *t*-Student-Neuman-Keuls como *post hoc* teste).

Para finalizar a avaliação da capacidade antioxidante *in vitro* foi realizado também um teste para analisar o potencial que as substâncias trabalhadas apresentam de impedir a ocorrência de peroxidação lipídica.

Essa peroxidação acontece a partir do ataque de espécies reativas, na maioria das vezes pelos radicais hidroxilas ($\text{OH}\cdot$), que retiram um átomo de hidrogênio de um grupo metileno, como os ácidos graxos poliinsaturados, deixando o carbono com um elétron desemparelhado, e na busca da estabilização da estrutura molecular ocorre a formação de dieno conjugado. Entretanto, quando esse dieno entra em contato com o oxigênio intracelular é formado o radical peroxila, este por sua vez subtrai um hidrogênio de moléculas de lipídeos adjacentes, reiniciando todo esse ciclo sucessivamente, propagando dessa forma os danos. Ao mesmo tempo em que o radical peroxila pode se ligar ao hidrogênio subtraído produzindo o lipídeo hidroperóxido que se degrada formando aldeídos como malonaldeído e 4-hidroxinonenaldeído. Tendo a Reação de Fenton importante papel gerador de radicais peroxilas e alcoxilas (VASCONCELOS et al., 2007).

Para realização desse teste foi utilizado o AAPH (2,2'-azobis 2-amidinopropano) que se trata de um azo composto com elevada solubilidade em água muito útil em experimentos *in vitro* que visem simular um processo oxidativo para avaliar o potencial antioxidante de diversas substâncias, funcionando como um gerador não-enzimático de radicais livres no momento em que é exposto a termólise a 37 °C. Quando o AAPH é decomposto ocorre formação de radicais livres centrados em carbono e liberação de gás nitrogênio (N_2), estes quando entram em contato com o oxigênio do meio ocorre reação imediata, e conseqüentemente produção de radicais peroxila ($\text{ROO}\cdot$) que atacam as membranas lipídicas iniciando a peroxidação (TANG; LIU, 2008).

Sendo assim, a quantificação da peroxidação lipídica por meio da determinação das substâncias reativas com o ácido tiobarbitúrico (TBARS) constitui um importante método para avaliar o potencial antioxidante *in vitro* de substâncias. De modo que no presente estudo, a nimodipina apresentou nas concentrações de 0,9 $\mu\text{g/mL}$; 1,8 $\mu\text{g/mL}$; 3,6 $\mu\text{g/mL}$; 5,4 $\mu\text{g/mL}$ e 7,2 $\mu\text{g/mL}$ potencial para diminuir em 75,33%; 77,44%; 78,25%; 79,48% e 79,63% a produção de espécies reativa com ácido tiobarbitúrico, em relação ao AAPH (**Figura 5**) ($p < 0,05$). Enquanto que o trolox produziu uma diminuição de 44,64%, segundo Ferreira e colaboradores (2012) o trolox é um ácido hidrossolúvel capaz de sequestrar duas moléculas de radicais peroxila ($\text{RO}_2\cdot$), impedindo a propagação da peroxidação lipídica nas membranas. Em adição, a nimodipina apresentou uma CE_{50} de aproximadamente 0,16 $\mu\text{g/mL}$, variando de 0,07 a 0,37 $\mu\text{g/mL}$, com intervalo de confiança de 96%.

Esses resultados corroboram com outro estudo que aponta a administração intraperitoneal de nimodipina, nas doses de 10 e 30 mg/kg, protegendo os ratos jovens de crises epiléticas pelo prolongamento das latências de crises epiléticas e mortes, além de diminuir acentuadamente a peroxidação lipídica, com a dose de 30 mg/kg também preservando a atividade normal da catalase (NASCIMENTO et al., 2005).

As administrações de nimodipina e outros bloqueadores dos canais de cálcio como verapamil, diltiazem e nifedipina nas doses de 10 e 20 mg/kg, também foram responsáveis por melhorar as alterações comportamentais e neuroquímicas em ratos com discinesia orofacial induzida por haloperidol, além de proporcionarem diminuição da peroxidação lipídica e aumentarem de forma significativa as dosagens cerebrais de SOD e catalase (BISHNOI; CHOPRA; KULKARNI, 2008).

Foi visto também que a azelnidipina atenuou a fibrose hepática em camundongos e aumentou suas defesas antioxidantes, com diminuição da peroxidação lipídica e danos oxidativos ao DNA, além de impedir a diminuição das enzimas antioxidantes (OHYAMA et al., 2012). Da mesma forma que o pré-tratamento como nitrendipina protegeu os animais contra a peroxidação lipídica no pulmão e nos tecidos cerebrais, além de elevar consideravelmente a concentração de SOD e GSH no pulmão e de GSH no fígado (AKTAY; EMRE; POLAT, 2011).

No entanto, quanto a capacidade dos LCNa em prevenir a peroxidação lipídica foi observado uma concordância com os testes anteriores (nitrito e radical hidroxila), aumento do potencial antioxidante de acordo com o aumento da concentração, ou seja, as concentrações em ordem crescente foram capazes de prevenir a peroxidação lipídica, inibindo a quantidade de TBARS formadas nas respectivas percentagens 75,38%, 81,70%, 85,70%, 86,05% e 86,40%, quando comparado com o AAPH (**Figura 6**). Por sua vez o trolox apontou potencial para reduzir apenas 44,64% da produção de TBARS ($p < 0,05$).

Dessa forma, pode ser verificado que os lipossomas de nimodipina apresentaram melhores resultados que a nimodipina isolada, impedindo a peroxidação lipídica de forma mais atuante inclusive do que o trolox. O que indica promissora atividade antioxidante da formulação, uma vez que tratamentos antioxidantes reduzem significativamente a produção de nitrito e de peroxidação lipídica, assim como aumentam a atividade da superóxido dismutase e da catalase no hipocampo de ratos adultos (CORTÉS; MORÁN, 2009; FERREIRA; ALMEIDA; FREITAS, 2012).

Foi comprovado também que para remover 50% das espécies reativas com o ácido tiobarbitúrico é necessária uma concentração de LCNa menor do que a de nimodipina (0,16

$\mu\text{g/mL}$), com uma CE_{50} de $0,12 \mu\text{g/mL}$ variando de $0,05$ a $0,25 \mu\text{g/mL}$, com intervalo de confiança de 98%.

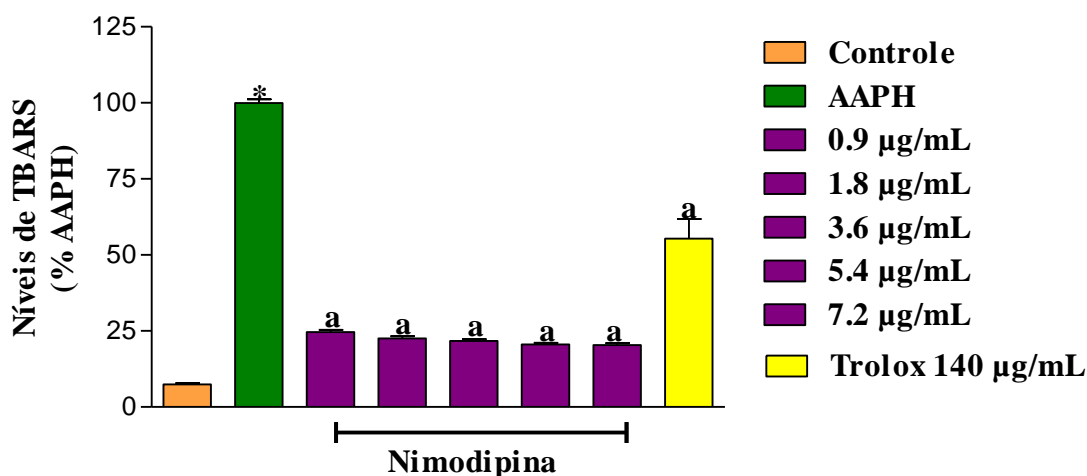
Existem disponíveis na literatura outros relatos de lipossomas que podem atuar de forma promissora no tratamento de doenças cerebrais (ZHAO et al., 2011), hepáticas(MANDAL et al., 2008) e pulmonares por desempenharem relevantes atividades antioxidantes. Como é o caso do pré-tratamento de células epiteliais do pulmão humano com lipossomas convencionais contendo Cu/Zn superóxido-dismutase que se mostraram eficientes para proteger essas células contra o estresse oxidativo, além de elevar consideravelmente as defesas antioxidantes celulares (RENGEL et al., 2005).

Em outro estudo foi constatado o efeito terapêutico dos lipossomas em lesões celulares, pela instilação de sulfeto de 2-cloroetil etilo em combinação consecutiva com a aplicação de lipossomas peguizados de catalase e superóxido dismutase que promoveram significativa atenuação do desenvolvimento da lesão pulmonar. Do mesmo modo, a co-instilação de lipossomas de agentes redutores, N-acetilcisteína, glutathiona ou resveratrol, promoveu uma redução significativamente da lesão pulmonar aguda (MCCLINTOCK et al., 2006).

Outra vantagem da formulação lipossomal é que ela pode solucionar algumas limitações farmacocinéticas do fármaco, como por exemplo, aumentar sua estabilidade, proporcionar maior proteção contra a degradação extracelular, promover uma liberação controlada do medicamento, o que garante a manutenção dos níveis séricos constantes, aumentando sua biodisponibilidade. Além de diminuir as doses das aplicações, diminuindo as chances de toxicidade e ampliando a segurança, condições que elevam a adesão do paciente ao tratamento (MAGALHÃES; MOSQUEIRA, 2010).

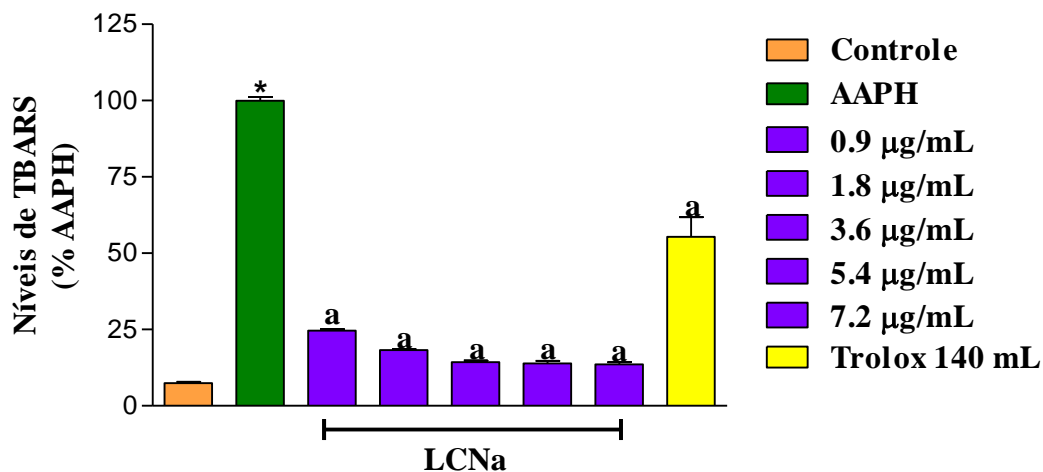
Diante disso, o encapsulamento da nimodipina em lipossomas proporcionará um melhor perfil farmacocinético e farmacodinâmico desse fármaco, de forma a aperfeiçoar seu potencial farmacológico, além de vislumbrar novas aplicações terapêuticas, como no tratamento de distúrbios cerebrais em que é evidenciado um intenso processo oxidativo que está relacionado com intensa produção de radicais livres como hidroxilas e superóxidos, tendo principal contribuição dos radicais lipídicos produzidos pela peroxidação lipídica (DORNAS et al., 2009).

Figura 5: Potencial antioxidante *in vitro* da nimodipina contra a formação de espécies reativas com o ácido tiobarbitúrico (TBARS)



Os valores representam a média \pm E.P.M. dos experimentos realizados em duplicata (n = 5).
^ap<0,05 *versus* AAPH; *p<0,05 *versus* controle (ANOVA seguido do teste *t*-Student-Neuman-Keuls como *post hoc* teste).

Figura 6: Potencial antioxidante *in vitro* da formulação lipossomal contendo nimodipina contra a formação de espécies reativas com o ácido tiobarbitúrico (TBARS)



Os valores representam a média \pm E.P.M. dos experimentos realizados em duplicata (n = 5).
^ap<0,05 *versus* AAPH; *p<0,05 *versus* controle (ANOVA seguido do teste *t*-Student-Neuman-Keuls como *post hoc* teste).

A partir dos resultados dos testes antioxidantes realizados com nimodipina e LCNa é possível afirmar, utilizando o teste estatística de regressão linear, que em todos os ensaios foram percebidas regressões lineares positivas, indicando melhora da ação antioxidante de acordo com o aumento da concentração (**Figura 7 e 8**).

Com base nesses dados estatísticos é possível confirmar que a nimodipina proporcionou relevante ação inibitória de TBARS ($r^2= 0,85$) e de radical hidroxila ($r^2= 0,53$) por possuírem percentuais de inibição elevados e constantes de acordo com o aumento das concentrações. Já este fármaco no teste do nitrito ($r^2= 0,88$) demonstrou maior variação da capacidade de remoção desse íon, com superior potencial inibitório somente na maior concentração (**Figura 7**).

Quando esta comparação é feita com o LCNa é percebido maior inibição dos íons nitrito ($r^2= 0,88$) e de espécies reativas com ácido tiobarbitúrico ($r^2= 0,71$), tendo essas dosagens valores de inibição muito próximos e também constantes, além de apresentar menor porcentagem de inibição dos radicais hidroxilas ($r^2= 0,87$) (**Figura 8**).

Figura 7: Regressão linear da capacidade de inibição de íons nitrito, radicais hidroxilas e TBARS proporcionada por diferentes concentrações de nimodipina

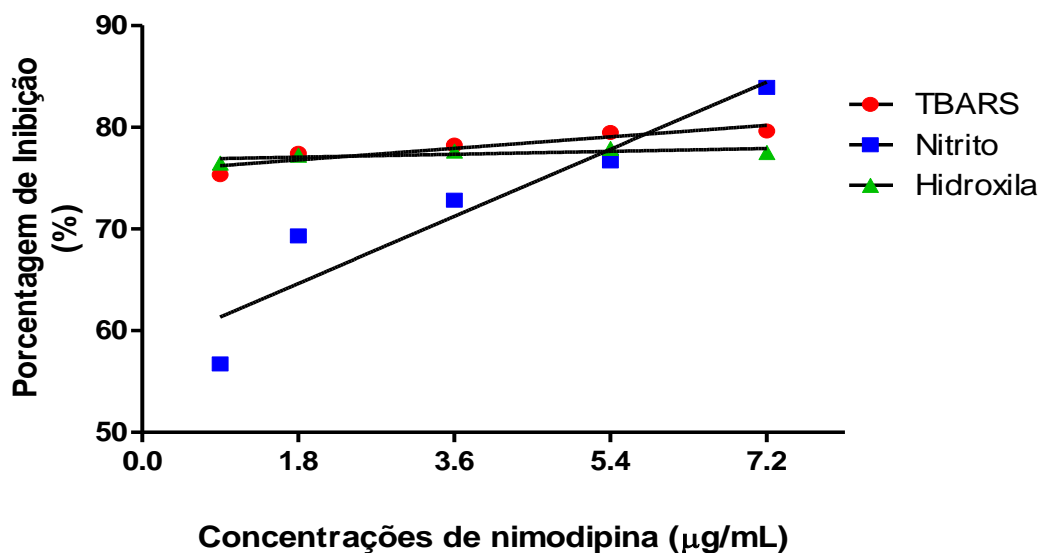
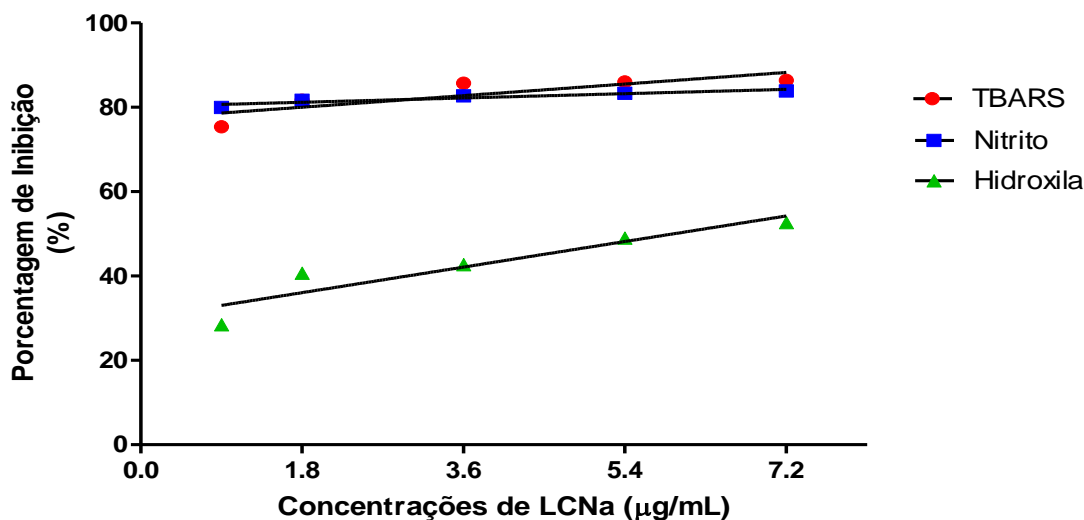


Figura 8: Regressão linear da capacidade de inibição de íons nitrito, radicais hidroxilas e TBARS proporcionada por diferentes concentrações de lipossomas contendo nimodipina



Após a realização dos testes *in vitro* foi possível propor um mecanismo de ação antioxidante para a nimodipina contra a formação dos radicais lipídicos, dos íons nitritos e dos radicais hidroxilas. Conforme demonstrado nas **Figuras 9 e 10** pode ser constatado que a nimodipina apresenta excelente atividade antioxidante, uma vez que esta molécula pode doar dois hidrogênios radicalares e adquirir caráter aromático no anel nitrogenado, transformando-se em piridina que é uma substância heteroaromática de elevado grau de estabilidade. A partir disso, podem ser explicados os relevantes resultados antioxidantes obtidos nos testes desse estudo.

Figura 9: Propriedade antioxidante da nimodipina

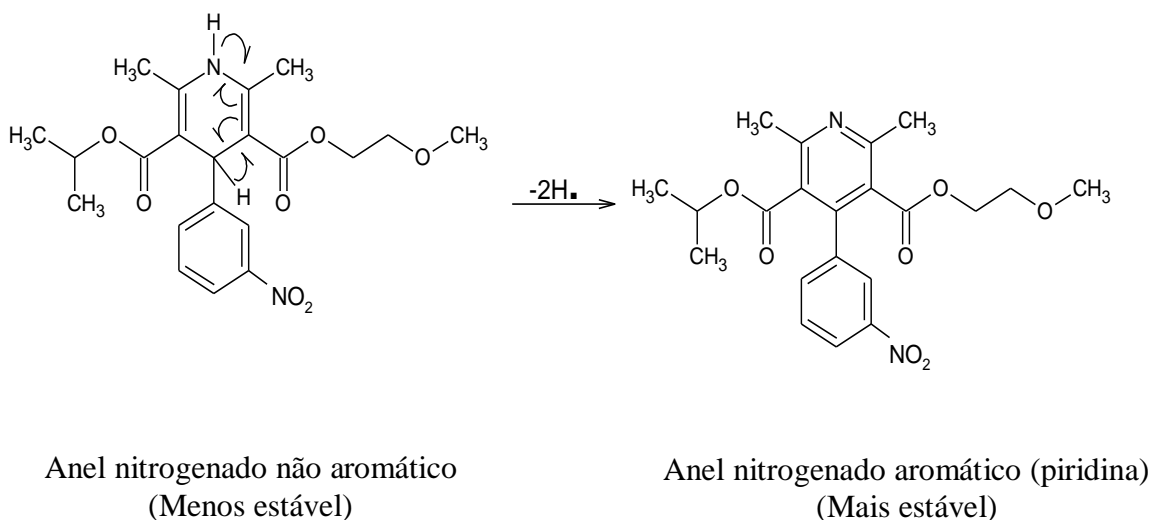
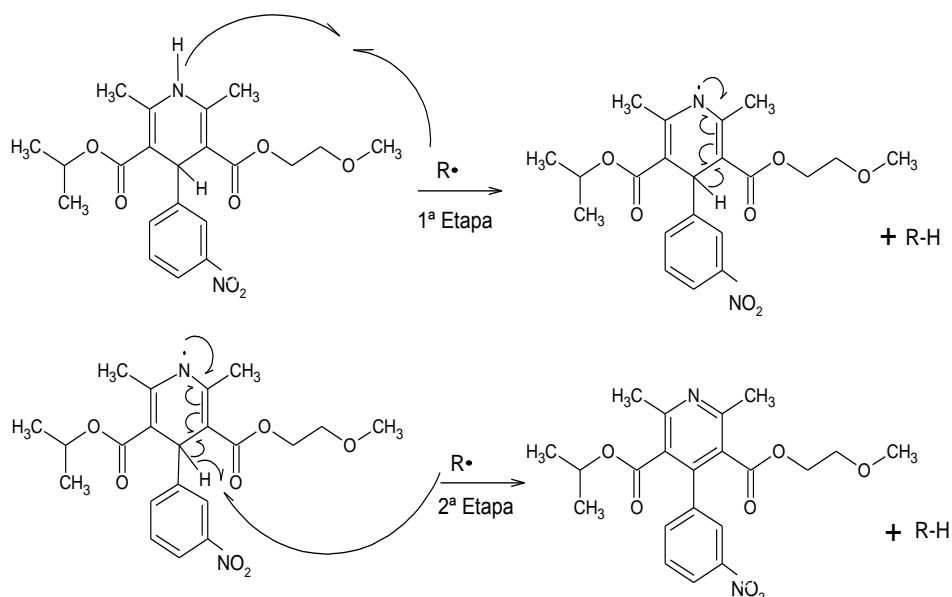
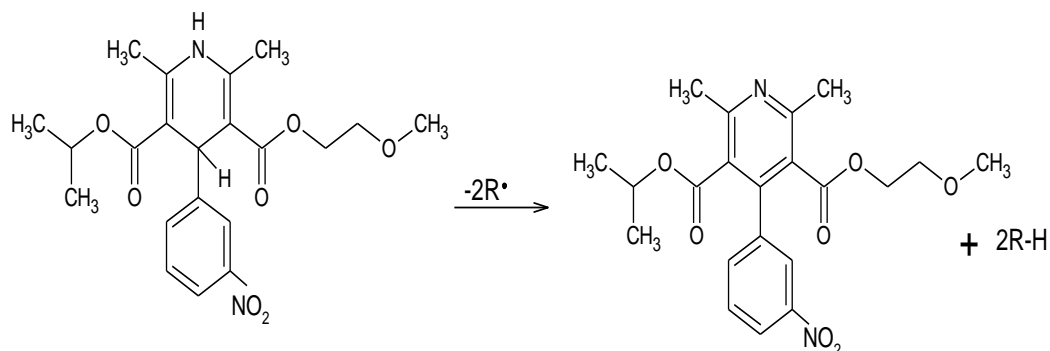


Figura 10: Possível mecanismo de sequestro de radicais livres pela nimodipina**a) Por etapas****b) Geral**

$R\cdot$ = Radical hidroxila ($HO\cdot$); Radical lipídico ($L\cdot$); Íon radical nitrito ($NO_2\cdot$)

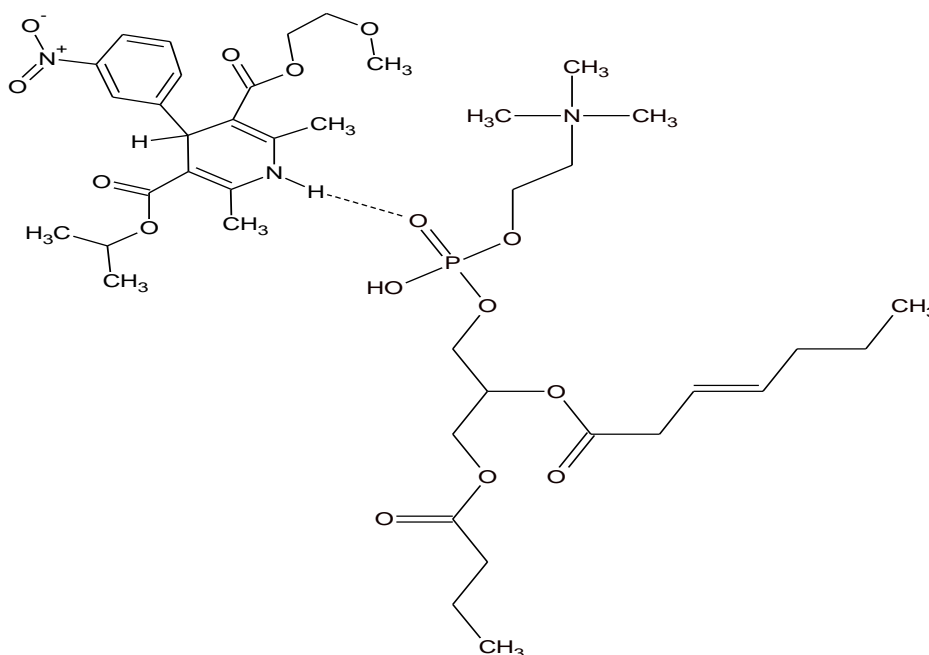
Dentro dessa mesma perspectiva, pode ser atribuída a superior capacidade antioxidante dos lipossomas de nimodipina devido a melhora da solubilidade desse fármaco, assim como a diminuição da superfície de contato desses sistemas carreadores que se encontram em escala nanométrica, o que aumenta seu potencial de interação, além dessas vesículas poderem promover a liberação controlada da nimodipina, entre outras vantagens.

Em adição, foi sugerido a provável influência dos lipídeos de membrana, fosfatidilcolina e colesterol, com a propagação do potencial antioxidante desse fármaco (**Figura 10**). De modo que quando a nimodipina foi encapsulada em lipossomas a atividade

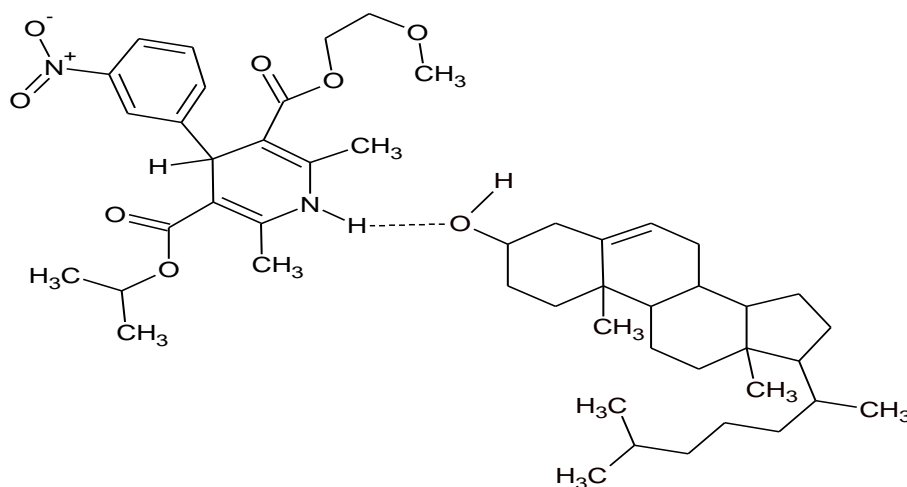
antioxidante aumentou nos testes de nitrito e TBARS, indicado haver maior liberação e dispersão do fármaco nesses meios reacionais. No entanto, o potencial antioxidante frente aos radicais hidroxilas não aumentou, sugerindo que neste meio a nimodipina liberada pode interagir com moléculas de fosfatidilcolina e colesterol, fazendo ligações de hidrogênio entre os oxigênios destes compostos e o hidrogênio ligado ao nitrogênio da nimodipina, impedindo dessa forma que a nimodipina exerça sua ação antioxidante de forma efetiva.

Figura 11: Interação da nimodipina com os lipídios dos lipossomas

a) Fosfatidilcolina



b) Colesterol



4 CONCLUSÃO

Embora os testes utilizados demonstrem um provável potencial antioxidante da nimodipina e de lipossomas contendo nimodipina, pode ser concluído que os LCNa são mais indicados para promoção desse efeito, uma vez que esse produziu melhores efeitos antioxidantes com uma quantidade de nimodipina bem menor, além de poderem proporcionar todos os benefícios dos nanossistemas liberadores de droga. Revelando que essa formulação pode exercer eficiente ação protetora *in vitro* das biomoléculas, como os lipídios das membranas celulares. Porém há necessidade de avaliar também a atividade antioxidante *in vivo* desses compostos para poder comprovar a eficiência desse efeito, no intuito de futuramente poder ser vislumbrada a aplicação dessa formulação no tratamento de diversas doenças que estejam envolvidas com processos oxidativos, como as que acometem o sistema nervoso central.

REFERÊNCIAS

- AHMADI, A.; EBRAHIMZADEH, M.A.; ASHRAFI, S. A.; KARAMI, M.; MAHDAVI, M.R.; SARAVI, S.S.S. Hepatoprotective, antinociceptive and antioxidant activities of cimetidine, ranitidine and famotidine as histamine H₂ receptor antagonists. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, v. 25, n. 1, p. 72-79, 2011.
- AKTAY, G.; EMRE, M.H.; POLAT, A. Influence of dihydropyridine calcium antagonist nitrendipine on benzo(a)pyrene-induced oxidative stress. **Archives of Pharmacal Research**, v. 34, n. 7, p. 1171-1175, 2011.
- ALAM, N.; BRISTI, N.J.; RAFIQUZZAMAN, M. Review on *in vivo* and *invitro* methods evaluation of antioxidant activity. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 21, n. 2, p. 143-152, 2012.
- ASLAN, A.; GURELIK, M.; CEMEK, M.; BUYUKOKUROGLU, M.; GOKSEL, H. M.; ESER, O. Nimodipine can diminish oxidative stress in patients with severe head trauma. **Journal of Neurosurgical Sciences**, v. 56, n. 3, p. 247-253, 2012.
- BARBOSA, K.B.F.; COSTA, N.M.B.; ALFENAS, R.D.C.G.; PAULA, S.O.; MINIM, V.P.R.; BRESSAN, J. Oxidative stress: concept, implications and modulating factors. **Revista de Nutrição**, v. 23, n. 4, p. 629-643, 2010.
- BARREIROS, A.; DAVID, J.M.; DAVID, J.P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v.29, n. 1, p. 113-123, 2006.
- BISHNOI, M.; CHOPRA, K.; KULKARNI, S.K. Protective effect of L-type calcium channel blockers against haloperidol-induced orofacial dyskinesia: a behavioural, biochemical and neurochemical study. **Neurochemical Research**, v. 33, n. 9, p. 1869-1880, 2008.

CAROCHO, M.; FERREIRA, I.C.F. R. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. **Food and Chemical Toxicology**, v. 51, p. 15-25, 2012.

CORTÉS, Y.R.; MORÁN, J. Role of oxidative stress and JNK pathway in apoptotic death induced by potassium deprivation and staurosporine in cerebellar granule neurons. **Neurochemistry International**, v. 55, n. 7, p. 581-592, 2009.

COUTO, M.A.L.; BRAZACA, S.G.C. Quantificação de vitamina C e capacidade antioxidante de variedades cítricas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, n. 1, p. 15-19, 2010.

DIGIESI, V.; FIORILLO, C.; COSMI, L.; ROSSETTI, M.; LENUZZA, M.; GUIDI, D.; PACE, S.; RIZZUTI, G.; NASSI, P. Reactive oxygen species and antioxidant status in essential arterial hypertension during therapy with dihydropyridine calcium channel antagonists. **La Clinica Terapeutica**, v. 151, n. 1, p. 15-18, 2000.

DORNAS, W. C.; OLIVEIRA, T. T. D.; DORES, R. G.R.; SANTOS, A. F. D.; NAGEM, T. J. Flavonóides: potencial terapêutico no estresse oxidativo. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 28, n. 3, p. 241-249, 2009.

FERREIRA, P.B.; ALMEIDA, A.A.C.; FREITAS, R.M. Antioxidant effect of buspirone in epilepsy model induced by pilocarpine. **Revista de Psiquiatria Clínica**, v. 39, n. 5, p. 153-156, 2012.

FORTES, A. C.; ALMEIDA, A. A. C.; MENDONÇA-JÚNIOR, F. J. B.; FREITAS, R. M.; SOARES-SOBRINHO, J. L.; SOARES, M. F. D. L. R. Anxiolytic properties of new chemical entity, 5TIO1. **Neurochemical Research**, v.38, n. 4, p. 1-6, 2013.

HIROOKA, Y.; SUNAGAWA, K. Calcium antagonists: current and future applications based on new evidence. Calcium channel blockers and autonomic nervous system. **Clinical Calcium**, v. 20, n. 1, p. 32-37, 2010.

KIZELSZTEIN, P.; OVADIA, H.; GARBUZENKO, O.; SIGAL, A.; BARENHOLZ, Y. Pegylated nanoliposomes remote-loaded with the antioxidant tempamine ameliorate experimental autoimmune encephalomyelitis. **Journal of Neuroimmunology**, v. 213, n. 1, p. 20-25, 2009.

LIRA, M. C. B.; SIQUEIRA-MOURA, M. P.; ROLIM-SANTOS, H. M. L.; GALETTI, F. C. S.; SIMIONI, A. R.; SANTOS, N. P.; EGITO, E. S. T.; SILVA, C. L.; TEDESCO, A. C.; SANTOS-MAGALHAES, N. S. In vitro uptake and antimycobacterial activity of liposomal usnic acid formulation. **Journal of Liposomes Research**, v.19, p.49-58, 2009.

MAGALHÃES, N. S.S.; MOSQUEIRA, V. C. F. Nanotechnology applied to the treatment of malaria. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 62, n. 4, p. 560-575, 2010.

MANDAL, A.K.; DAS, S.; MITRA, M.; CHAKRABARTI, R.N.; CHATTERJEE, M.; DAS, N. Vesicular flavonoid in combating diethylnitrosamine induced hepatocarcinoma in rat model. **Journal of Experimental Therapeutics & Oncology**, v. 7, n. 2, p. 123-133, 2008.

MARQUES, T.H.C.; MELO, C.H.S.; FREITAS, R.M. *In vitro* evaluation of antioxidant, anxiolytic and antidepressant-like effects of the *Bellis perennis* extract. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 22, n. 5, p. 1044-1052, 2012.

MCCLINTOCK, S.D.; HOESEL, L.M.; DAS, S.K.; TILL, G.O.; NEFF, T.; KUNKEL, R.G.; SMITH, M.G.; WARD, P.A. Attenuation of half sulfur mustard gas-induced acute lung injury in rats. **Journal of Applied Toxicology**, v. 26, n. 2, p. 126-131, 2006.

MORAIS, S.M.; CAVALCANTI, E.S.B.; COSTA, S.M.O.; AGUIAR, L.A. Ação antioxidante de chás e condimentos de grande consumo no Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 1b, p. 315-320, 2009.

NASCIMENTO, V.S.; D'ALVA, M.S.; OLIVEIRA, A.A.; FREITAS, R.M.; VASCONCELOS, S.M.M.; SOUSA, F.C.F.; FONTELES, M.M.F. Antioxidant effect of nimodipine in young rats after pilocarpine-induced seizures. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 82, n. 1, p. 11-16, 2005.

NOGUEIRA NETO, J.D.; SOUSA, D. P.; FREITAS, R.M. Avaliação do potencial antioxidante *in vitro* do nerolidol. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 34, n. 1, p. 125-130, 2013.

NUNES, L. C. C.; GALINDO, A. B.; LUSTOSA, S. R.; BRASILEIRO, M. T.; EGITO, A. A.; FREITAS, R. M.; RANDAU, K. P.; NETO, P. J. R. Influence of Seasonal Variation on Antioxidant and Total Phenol Activity of Red Propolis Extracts. **Advanced Studies in Biology**, v. 5, n. 3, p. 119-133, 2013.

OHYAMA, T.; SATO, K.; KISHIMOTO, K.; YAMAZAKI, Y.; HORIGUCHI, N.; ICHIKAWA, T.; KAKIZAKI, S.; TAKAGI, H.; IZUMI, T.; MORI, M. Azelnidipine is a calcium blocker that attenuates liver fibrosis and may increase antioxidant defence. **British Journal of Pharmacology**, v. 165, n. 4, p. 1173-1187, 2012.

OLIVEIRA, L.C.; TAVEIRA, E.J.F.; SOUZA, L.G.; MARRETO, R.N.; LIMA, E.M.; TAVEIRA, S.F. Aplicações das Nanopartículas Lipídicas no Tratamento de Tumores Sólidos: Revisão de Literatura. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 58, n. 4, p. 695-701, 2012.

PANIN, V.L.; KAMIYA, T.; ZHANG, H.; HAYASHI, T.; TSUCHIYA, A.; SEHARA, Y.; DEGUCHI, K.; YAMASHITA, T.; ABE, K. Prevention of neuronal damage by calcium channel blockers with antioxidative effects after transient focal ischemia in rats. **Brain Research**, v. 1176, p.143-150, 2007.

PENG, C.H.; CHANG, C.H.; PENG, R.Y.; CHYAU, C.C. Improved membrane transport of astaxanthine by liposomal encapsulation. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 75, n. 2, p. 154-161, 2010.

PINHO, R.A.; ARAÚJO, M.C.; MELO, G.L.G; BENETTI, M. Doença arterial coronariana, exercício físico e estresse oxidativo. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 94, n. 4, p. 549-555, 2010.

QUINTANS-JÚNIOR, L.J.; GUIMARÃES, A.G.; SANTANA, M.T.D.; ARAÚJO, B. E.S.; MOREIRA, F.V.; BONJARDIM, L.R.; ARAÚJO, A.A.S.; SIQUEIRA, J.S.; ANTONIOLLI, Â.R.; BOTELHO, M.A. Citral reduces nociceptive and inflammatory response in rodents. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 21, n. 3, p. 497-502, 2011.

RENGEL, R. G.; GRČIĆ, J. F.; ČEPELAK, I.; GRUBIŠIĆ, T. Z.; BARIŠIĆ, K. The effect of liposomes with superoxide dismutase on A2182 cells. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 60, n. 1, p. 47-51, 2005.

RIVERA, F.; COSTA, G.; ABIN, A.; URBANAVICIUS, J.; ARRUTI, C.; CASANOVA, G.; DAJAS, F. Reduction of ischemic brain damage and increase of glutathione by a liposomal preparation of quercetin in permanent focal ischemia in rats. **Neurotoxicity Research**, v. 13, n. 2, p. 105-114, 2008.

SERAFINI, M.R.; SANTOS, R.C.; GUIMARÃES, A.G.; SANTOS, J.P.A.; CONCEIÇÃO SANTOS, A.D.; ALVES, I.A.; GELAIN, D.P.; NOGUEIRA, P. C. L.; QUINTANS-JÚNIOR, L.J.; BONJARDIM, L.R. *Morindacitrifolia* Linn leaf extract possesses antioxidant activities and reduces nociceptive behavior and leukocyte migration. **Journal of Medicinal Food**, v. 14, n. 10, p. 1159-1166, 2011.

SHINOMIYA, K.; MIZUSHIGE, K.; FUKUNAGA, M.; MASUGATA, H.; OHMORI, K.; KOHNO, M.; SENDA, S. Antioxidant effect of a new calcium antagonist, azelnidipine, in cultured human arterial endothelial cells. **Journal of International Medical Research**, v. 32, n. 2, p. 170-175, 2004.

SILVA, O.A.; OLIVEIRA, F.R.D.A.M.; LIMA, T.C.; SOUSA, D.P.; SOUZA, A.A.; FREITAS, R.M. Evaluation of the antioxidant effects *invitro* of the isopulegone. **Free Radicals and Antioxidants**, v. 2, n. 4, p. 50-55, 2012.

TANG, Y.Z.; LIU, Z.Q. Chemical kinetic behavior of chlorogenic acid in protecting erythrocyte and DNA against radical-induced oxidation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 22, p. 11025-11029, 2008.

VASCONCELOS, S.M.L.; GOULART, M.O. F.; MOURA, J.B.D.F.; MANFREDINI, V.; BENFATO, M.D.S.; KUBOTA, L.T. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Química Nova**, v. 30, n. 5, p. 1323-1338, 2007.

ZHAO, G.; ZANG, S.Y.; JIANG, Z.H.; CHEN, Y.Y.; JI, X.H.; LU, B.F.; WU, J.H.; QIN, G.W.; GUO, L.H. Postischemic administration of liposome-encapsulated luteolin prevents against ischemia-reperfusion injury in a rat middle cerebral artery occlusion model. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 22, n. 10, p. 929-936, 2011.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir dos resultados obtidos é possível afirmar que as pesquisas com preparações lipossomais representam uma crescente e expressam importantes efeitos antioxidantes e neuroprotetores que podem ser muito úteis no tratamento ou prevenção de diversas patologias como as que acometem o sistema nervoso central. Nesse mesmo sentido, pode ser demonstrado também que lipossomas contendo nimodipina apresentam relevante potencial ansiolítico, mediado por sua interação com o sistema GABAérgico, sem apresentar comprometimento da atividade e coordenação motora dos animais. Além de revelar marcante potencial antioxidante *in vitro* frente a radicais livres, com uma quantidade de fármaco muito inferior de nimodipina.

Porém é importante destacar a necessidade da continuação da caracterização da formulação e de experimentos *in vivo* para comprovar a eficácia da propriedade antioxidante dos lipossomas, assim como a realização de testes que comprovem a segurança do LCNa para aplicação no tratamento da ansiedade e outras patologias cerebrais relacionadas com o estresse oxidativo. No entanto, desde já pode se destacar a positiva utilização desses sistemas carreadores de drogas por promovem a propagação das atividades farmacêuticas desejada, reforçando a hipótese da utilização da nanotecnologia como instrumento de enorme potencial para produção de novas alternativas terapêuticas para o tratamento e prevenção de diversas patologias cerebrais.

**PRODUÇÃO CIENTÍFICA
E TECNOLÓGICA**

- *Depósito de pedido de patente*

SANTOS, H. M. L. R.; OLIVEIRA, G. Z. S.; MORENO, L. C. G. A. I.; CAVALCANTI, I. M. F.; MAGALHÃES, N. S. S.; FREITAS, R. M. Processo de obtenção, uso e aplicação farmacêuticas da formulação convencional contendo nimodipina direcionada ao tratamento de ansiedade e convulsão e depressão. - Patente requerida junto ao INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial com número de protocolo: 000138.

- *Apresentações de Trabalho Científicos*

OLIVEIRA, G. Z. S., MORENO, L. C. G. A. I., OLIVEIRA, J. S., ALMEIDA, V. P. A., FREITAS, R. M., SANTOS, H. M. L. R. **Investigação do Mecanismo de Ação Ansiolítico de uma Formulação Lipossomal contendo Nimodipina (LCNa)**. Apresentação de banner no I Encontro Estratégico em Ciências Farmacêuticas e I Seminário Ibero Americano de P & D de Medicamentos, realizado em Teresina, PI, no período de 4 a 6 de abril de 2013.

MORENO, L. C. G. A. I., OLIVEIRA, G. Z. S., PINHEIRO-SEGUNDO, M. A. S, FREITAS, R. M., SANTOS, H. M. L. R., MAGALHAES, N. S. S. **Delineamento e caracterização de lipossomas contendo nimodipina para uso direcionado ao tratamento da ansiedade, depressão e convulsão**. Apresentação de banner no I Encontro Estratégico em Ciências Farmacêuticas e I Seminário Ibero Americano de P & D de Medicamentos, realizado em Teresina, PI, no período de 4 a 6 de abril de 2013.

OLIVEIRA, G. Z. S., MORENO, L. C. G. A. I., OLIVEIRA, J. S., ALMEIDA, V. P. A., FREITAS, R. M., SANTOS, H. M. L. R. **Os principais avanços científicos das formulações farmacêuticas lipossomais relacionados à promoção de efeitos antioxidantes e neuroprotetores** Apresentação de banner no I Encontro Estratégico em Ciências Farmacêuticas e I Seminário Ibero Americano de P & D de Medicamentos, realizado em Teresina, PI, no período de 4 a 6 de abril de 2013.

OLIVEIRA, L. G. C., SILVA, A. G. R. , SILVA, A. K. P., BARBOSA, V. R. A., MACEDO, J. M., OLIVEIRA, G. Z. S. **A incidência de câncer de boca nos pacientes dependentes químicos atendidos pelo serviço hospitalar**. Apresentação oral no III Congresso Brasileiro de Saúde Mental, realizado em Fortaleza, CE, no período de 7 a 9 de junho de 2012.

GUERRA, E. M., OLIVEIRA, G. Z. S., ROCHA, F. D. L. M., SILVA, S. T. C., CARVALHO, R. M., PEREIRA, R. M., MACHADO, J. L. C., GOMES JUNIOR, A. L., CAVALCANTE, A. A. C. M. **Análise da capacidade citotóxica da dipirona sódica pelo teste citogenético *allium cepa***. Apresentação oral no I Simpósio de Nanotecnologia do Nordeste, realizado em Luís Correia, PI, no período de 2 a 4 de junho de 2012.

OLIVEIRA, G. Z. S., PINHEIRO, A. M. V. N. **Análise da toxicidade renal e hepática em cães com leishmaniose visceral tratados com telurana RF-07**. Apresentação em banner no 64ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência, realizado em São Luís, MA, no período de 22 a 27 de junho de 2012.

SERVIO, C. L. R., RIBEIRO, D. M., OLIVEIRA, G. Z. S., LIMA, P. F. M., REIS, A. S. **Análise físico-química e microbiológica dos cubos de gelo produzidos e comercializados em Teresina-PI**, Apresentação em banner no 64ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência, realizado em São Luís, MA, no período de 22 a 27 de junho de 2012.

MENDES, M. C. S., SILVA, A. P. S. C. L., POLICARPO, P. R., NUNES, L. C. C, RIOS, V. M., OLIVEIRA, G. Z. S., MORENO, L. C. G. E. A. I., OLIVEIRA, F. R. D. A. M. D, FREITAS, R. M. **Avaliação da toxicidade aguda em doses repetidas, subcrônica e crônica, em camundongos, tratados com extrato aquoso do pó de mesocarpo de *Orbignya phalerata* Mart**, Apresentação em banner na XXVII Reunião Anual da Federação de Sociedade de Biologia Experimental –FESBE, realizado em Águas de Lindóia, SP, no período de 22 a 25 de agosto de 2012.

ROCHA, F. D. L. M., OLIVEIRA, G. Z. S., GUERRA, E. M., SILVA, S. T. C., CARVALHO, R. M., PEREIRA, R. M., ARAUJO, A. A. R., CAVALCANTE, A. A. C. M. **Avaliação de efeitos genotóxicos da isotretinoína em células do epitélio bucal expostas “ex vivo”**. Apresentação oral no I Simpósio de Nanotecnologia do Nordeste, realizado em Luís Correia, PI, no período de 2 a 4 de junho de 2012.

OLIVEIRA, G. Z. S., OLIVEIRA, J. S., ALMEIDA, V. P. A., MORENO, L. C. G. E. A. I., FREITAS, R. M., SANTOS, H. M. L. R. **Determination of nitrite and TBARs in hippocampus of mice treated with liposomes containing nimodipine**, Apresentação em banner no IV International Symposium in Biochemistry of Macromolecules and

Biotechnology e XI Reunião Regional Nordeste da SBBQ, realizado em Recife, PE, no período de 5 a 7 de dezembro de 2012.

OLIVEIRA, G. Z. S., MORENO, L. C. G. E. A. I., MENDS, M. C. S., SILVA, A. P. S. C. L., FREITAS, R. M., MAGALHAES, N. S. S., SANTOS, H. M. L. R. **Development, characterization and acute toxicity studies of liposomal formulation containing a dihydropyridine.** Apresentação em banner na XXVII Reunião Anual da Federação de Sociedade de Biologia Experimental –FESBE, realizado em Águas de Lindóia, SP, no período de 22 a 25 de agosto de 2012.

OLIVEIRA, G. Z. S., OLIVEIRA, J. S., ALMEIDA, V. P. A., MORENO, L. C. G. E. A. I., LOURENCO, N. V., ANDRADE, T. C. B., FREITAS, R. M., SANTOS, H. M. L. R. **Efeito Antioxidante do LCNa: Dosagem de nitrito,** Apresentação em banner no I Workshop de projeto e dissertações, realizado em Teresina, PI, no período de 30 e 31 de outubro de 2012.

OLIVEIRA, L. G. C., SILVA, A. G. R. , SILVA, A. K. P., BARBOSA, V. R. A., MACEDO, J. M., OLIVEIRA, G. Z. S. **Perfil epidemiológico dos usuários de drogas atendidos pelo serviço hospitalar de referencia AD - Hospital do Mocambinho.** Apresentação oral no III Congresso Brasileiro de Saúde Mental, realizado em Fortaleza, CE, no período de 7 a 9 de junho de 2012.

OLIVEIRA, G. Z. S., PIRES, L. F., PEREIRA, R. M., OLIVEIRA, A. N., SOARES, F. M., FREITAS, R. M. **Perfil epidemiológico dos usuários portadores de distúrbios psicossociais atendidos em um Centro de Atenção Psicossocial.** Apresentação oral no III Congresso Brasileiro de Saúde Mental, realizado em Fortaleza, CE, no período de 7 a 9 de junho de 2012.

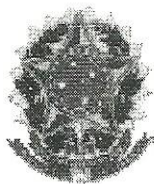
OLIVEIRA, G. Z. S., PIRES, L. F., PEREIRA, R. M., OLIVEIRA, A. N., OLIVEIRA, L. G. C., FREITAS, R. M. **Prática do tabagismo versus transtornos psicossociais em usuários de um Centro de Atenção Psicossocial: Existe alguma inter-relação?.** Apresentação oral no III Congresso Brasileiro de Saúde Mental, realizado em Fortaleza, CE, no período de 7 a 9 de junho de 2012.

MORENO, L. C. G. A. I., OLIVEIRA, G. Z. S., COSTA, D. A., COSTA, J. P., FREITAS, R. M., MAGALHAES, N. S. S., SANTOS, H. M. L. R. **Studies of activity anxiolytic of a liposomal formulation containing a drug of the dihydropyridine group (LCNa).** Apresentação em banner na XXVII Reunião Anual da Federação de Sociedade de Biologia Experimental –FESBE, realizado em Águas de Lindóia, SP, no período de 22 a 25 de agosto de 2012.

ANDRADE, T. C. B., GOMES JUNIOR, A. L., OLIVEIRA, G. Z. S., ANDRADE, M. H., LIM, T. F., FREITAS, R. M., LIMA, S. G. **Toxicidade aguda do estragol em camundongos.** Apresentação em banner no I Workshop de projeto e dissertações, realizado em Teresina, PI, no período de 30 e 31 de outubro de 2012.



ANEXOS

ANEXO A: Declaração de aceite do comitê de ética em experimentação animal

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO COM ANIMAIS
Campus Universitário Ministro Petrônio Portela, Bairro Ininga, Teresina, Piauí, Brasil; CEP: 64049-550
Telefone (86) 32155734 – e-mail: cecapi@ufpi.br

Teresina, 20 de setembro de 2011.

Ao (A)

Prof (a): Dr. Rivelilson Mendes de Freitas
Departamento de Bioquímica e Farmacologia/ CCS / UFPI

Sr. (a) Pesquisador (a)

Declaro para os devidos fins que o projeto de pesquisa intitulado: "**Estudo da atividade farmacológica e toxicológica de uma preparação lipossomal derivada de diidropiridinas (LCN1)**", foi avaliado pelo Comitê de ética em Experimentação com Animais – CEEA/UFPI teve parecer **APROVADO** sob o nº. **014/11**. Esclarecemos que o mesmo se encontra de acordo com os requisitos exigidos para apreciação de projetos de pesquisa.

Atenciosamente,


Prof^a. Ivete L. de Mendonça
Comitê de Ética em Experimentação Animal-UFPI
Coordenadora

ANEXO B: Declaração do depósito de pedido de patente submetido ao Instituto Nacional de Propriedade Industrial por meio do Núcleo de Inovação e Transferência de Tecnológica na Universidade Federal do Piauí



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
NÚCLEO DE INOVAÇÃO E TRANSFERÊNCIA DE TECNOLOGIA
Campus Universitário Ministro Petrônio Portela, Setor de Convivência L09 e L10
Bairro Ininga CEP: 64049-550-Teresina-PI Fone/Fax (86)3237-1638

DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que a Universidade Federal do Piauí, através do Núcleo de Inovação e Transferência de Tecnologia da UFPI – NINTEC –, efetuou às 10:46 horas do dia 23/08/2012, sob o número de Protocolo do INPI: 000138 o depósito de pedido de Patente de Invenção intitulada "**Processo de obtenção, uso e aplicações farmacêuticas da formulação lipossomal convencional contendo nimodipina direcionada ao tratamento da ansiedade e depressão e convulsão**", com co-titularidade entre Universidade Federal do Piauí e Universidade Federal de Pernambuco, desenvolvida pelos inventores:

Hercília Maria Lins Rolim Santos

Gizelle Zayra da Silva de Oliveira

Lina Clara Gayoso e Almendra Ibiapina Moreno

Isabella Macário Ferro Cavalcanti

Nereide Stela Santos Magalhães

Rivelilson Mendes de Freitas

Teresina, 23 de agosto de 2012.

Profa. Dra. Maria Rita de Moraes Chaves Santos
Coordenadora do Núcleo de Inovação e Transferência de Tecnologia

ANEXO C: Confirmação de submissão à revista Journal of Liposome Research

26/07/13

Manuscripts ScholarOne

**Journal of
Liposome Research****informa**
healthcare[Edit Account](#) | [Instructions & Forms](#) | [Log Out](#) | [Get Help Now](#)SCHOLARONE™
Manuscripts[Menu Principal](#) → [Autor do Dashboard](#) → Confirmação de Submission

Você está logado como Giselle Oliveira

**Submission
Confirmation**Obrigado por enviar seu manuscrito para *Journal of Research Liposome* .

Manuscrito ID: LLPR-2013-0050

Título: Os maiores avanços científicos de preparações farmacêuticas de lipossomas com efeito neuroprotetor e antioxidante

Autores: Oliveira, Giselle
Almeida, Viviane
Oliveira, Johanssy
Moreno, Lina
Freitas, Rivelilson
Magalhães, Nereide
Rolim, Hercília

Data de Submissão: 26-Jul-2013

 Print  Return to Dashboard

ScholarOne Manuscripts™ v4.12 (patente # 7257767 e # 7263655). © ScholarOne, Inc., 2013. . Todos os Direitos Reservados
Manuscripts ScholarOne é marca registrada da ScholarOne, Inc. ScholarOne é uma marca registrada da ScholarOne, Inc.
ScholarOne Siga no Twitter [Termos e Condições de Uso](#) - [Política de Privacidade ScholarOne](#) - [Get Help Now](#)



APÊNDICES

APÊNDICE A: Artigo submetido à Revista Journal of Liposomes Research**The major scientific advances of liposomal pharmaceutical preparations with neuroprotective and antioxidant effects**

Giselle Zayra da Silva de Oliveira^{1*}; *Viviane Pinheiro Alves de Almeida*²; Johanssy da Silva Oliveira²; Lina Clara Gayoso e Almendra Ibiapina Moreno³; Nereide Stela Santos Magalhães³; Rivelilson Mendes de Freitas¹; Hercilia Maria Lins Rolim¹

¹Postgraduate Program in Pharmaceutical Sciences from the Federal University of Piauí, Teresina, Piauí, Brazil.

²Pharmacy Course at the Federal University of Piauí, Teresina, Brazil.

³Postgraduate Program in Pharmaceutical Sciences from the Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil.

* Giselle Zayra da Silva de Oliveira. Department of Biochemistry and Pharmacology, Center for Health Sciences, Federal University of Piauí. Campus Minister Petronio Portella, Neighborhood Ininga, Teresina, Piauí, Brazil. CEP: 64049-550, Phone: +55 86 3237-1240, email: gisellezayra@gmail.com

Keywords: Long circulatory; Nanotechnology; Sustained release.

ABSTRACT

In recent years increasingly has proven the therapeutic action of liposomal systems. The purpose of this integrative review was to conduct a survey of articles published in the last ten years that addressed the scientific benefits provided by liposomal preparations with effects neuroprotective and/or antioxidants. Therefore, a search was made for articles using Science Direct, VHL (Virtual Health Library), PubMed and SciELO electronic databases. Initially, the search words *liposomes* and *antioxidants* and *neuroprotective agents* were used and subsequently, the articles with the search words *liposomes (antioxidants or neuroprotective agents)* and *glutathione* and *catalase* were added. As a result, 1 734 articles were found, 13 of these were selected according to exclusion criteria of research. The results of this study indicated that articles on this topic are constantly growing, with particular emphasis from 2008, year with the highest number of publications. From 2008 up to date are included 61.5% of all the articles published. In these articles was also found the marked presence of compounds isolated from encapsulated medicinal plants, representing 61.5% of the substances used. Moreover, it can be seen that the conventional liposomes were the most used, although there being records of pegylated and site-specific liposomes among the selected articles. These liposomes have acted in a number of pathologies such as hepatocellular carcinoma, autoimmune encephalomyelitis, anxiety, and neurodegenerative diseases such as Parkinson's disease and Alzheimer's disease. Suggesting that the application of nanotechnology in the pharmaceutical industry is a good alternative for production of new neuroprotective and antioxidant drugs.

1 INTRODUCTION

Liposomes are spherical lipid vesicles which can have natural phospholipids and cholesterol in their composition, besides presenting various sizes that can vary from 50 nm up to several micrometers in diameter. They were discovered in 1961 by Alec Bagham who

performed experiments on blood clotting, when he noticed that when mixing water with phospholipids, lipid vesicles were formed (KUMAR; BHOWMIK; DEB, 2012)

Its formation process happens due to the amphoteric nature of the phospholipids, which in contact with aqueous solutions form spherical lipid vesicles with the hydrophilic part facing the inside in which water-soluble drugs are stored, and the hydrophobic facing the outside, region in which the lipophilic drugs are immersed between the lipid membranes. The lipid nature of liposomes favors the controlled release of drugs, since they can be fused with other lipid bilayers such as those cellular. This nanosystem also has the improvement of pharmacokinetics as advantage and better biodistribution of substances such as drugs, recombinant proteins, vaccines and oligonucleotides. Besides being the pioneers in the use of clinical practice, the only authorized for intravenous administration so far (Oliveira et al., 2012).

Like Doxil, the first pharmaceutical liposomal formulation marketed with the active ingredient doxorubicin, targeted for the treatment of Kaposi's sarcoma associated with acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) (Barenholz, 2012). Likewise, studies are being conducted to demonstrate the antioxidant and neuroprotective potential of liposomal formulations in the encapsulation of substances of natural or synthetic origin (Kizelsztejn et al., 2009; Wang et al., 2011).

By definition, antioxidant substances are all those involved in the inhibition of an oxidative process, their participation assist in maintaining the oxidative balance in the body, inhibiting the occurrence of cellular damage (Halliwell, 2011). Therefore being perceived stronger involvement of oxidants agents or free radicals such as reactive species derived from oxygen and nitrogen in various pathologies, including those neurological (Freitas et al., 2010; Ferreira; Almeida; Freitas, 2012).

Thus, the present review aimed at analyzing the scientific production of articles that addressed the topic of liposomal preparations with neuroprotective and/or antioxidant

potential published in the last ten years, based on the following criteria: verifying the origin of substances (natural or synthetic) being the main targets of liposomal nanocarriers, as well as quantifying the articles according to the years of their publications, the types of liposomes used and major diseases addressed in these articles.

2 MATERIAL AND METHODS

The accomplishment of this literature review was possible through the search of original articles in full. Initially, a consultation for the index was performed as permutation in the DeCS bank (Descriptors in Health Sciences) of the Virtual Health Library (VHL); it allowed the selection of search words. Subsequently, the articles on the Science Direct, VHL, PubMed and SciELO electronic databases were analyzed, using the selection of articles with some correlation in the title or abstract and objectives proposed by the review as a search criterion or initial inclusion. Articles in English, Portuguese and Spanish published over the last ten years (January 2003 to July 2013) were considered. Exclusion criteria were: articles that lacked the content of the title or abstract results reporting the neuroprotective and/or antioxidant potential of liposomes, in addition to articles published in languages other than those aforementioned, articles published over ten years or repeated in more than one basis, those not fully obtained or literature reviews and non-experimental studies, as well as dissertations, theses, summary proceedings, news sites, books and chapters.

The collection of articles started on the Science Direct, then continued through the VHL, PubMed and SciELO using the search *liposomes* and *antioxidants* and *neuroprotective agents*. Subsequently, there was a need to expand the search words to find results that related more specifically the antioxidant and/or neuroprotective potential of liposomal preparations with strengthening of enzymatic endogenous antioxidant defenses. Thus, also the articles found with search words *liposomes* and (*antioxidants* or *neuroprotective agents*)

and *glutathione* and *catalase* were added to the review using the same inclusion and exclusion criteria of the previous search words.

3 RESULTS AND DISCUSSION

At the end of the bibliographic search have been found 1 734 articles on the databases analyzed, all in English, but only 13 met the goals and inclusion criteria for this integrative review (**Table 1**). Selected articles were separated by topics for discussion, according to pharmacological effect and nature of the encapsulated substance.

Out of the thirteen articles selected, eight had liposomes from substances of natural origin and five with synthetic origins. The main pathologies highlighted in these articles were hepatocellular carcinoma, autoimmune encephalomyelitis, anxiety and neurodegenerative diseases, such as Parkinson's disease and Alzheimer's disease. Also, there was improvement of liver function, reversal of lung injury, neuroprotection against injuries produced by alcohol and ischemic brain damage. According to their ability to interact with the biological environment, liposomes can be divided into conventional, pegylated and site-specific. In this review of the literature were found eight articles reporting the presence of conventional liposomes, three articles on pegylated liposomes and two articles on site-specific liposomes: one on manosides and other on galactosides.

Reports of studies on this topic represent a growing, with particular emphasis from 2008 (year of highest number of publications), this year until today concentrates 61.5% of the articles published. By dividing articles according to the years of publication, there is one in 2004, one article in 2005, two articles in 2006, one article in 2007, three articles in 2008, one article in 2009, two articles in 2010 and two in 2011. All data can be observed in **Table 2**, which presents a characterization of selected articles according to their authors, goals, conclusions, publication years and substances encapsulated.

Currently, there is a strong trend to using nanotechnology as a delivery system for drugs for the treatment of neurodegenerative diseases, especially Alzheimer's disease and Parkinson's disease, once this science contributes to the development of nanoparticles with high specificity by capillary endothelial cells in the brain, which enhances the interaction of drugs with the respective target sites so as to raise the pharmacological effect and reduce the side effects. These nanoparticles can even block or reverse the neuropathological processes by providing the drug penetration into the central nervous system (CNS) and still maintain constant drug levels in the circulation for days, weeks and months. Being a therapeutic option for promoting neuroprotection against oxidative stress, nerves nanorepair, diagnosis of Alzheimer's disease and nanoneuromodulation (Modi, et al., 2009; Brambilla et al., 2011, Khawaja, 2011; Sahni et al., 2011; Nunes; Jamal; Kostarelos, 2012).

3.1 ANTIOXIDANT ACTION OF LIPOSOMES CONTAINING SUBSTANCES OF NATURAL ORIGIN

Natural substances are being increasingly targeted of encapsulation in liposomal models for assessment and/or improvement of their antioxidant capacity. Exemplifying this trend, the developing of liposomes from extracts or substances isolated from medicinal plants. This study found five articles reporting the antioxidant potential of liposomal preparations of substances of natural origin, with special attention to the class of flavonoids that led the composition of these systems, with 80% share of the articles found in the experiments.

As is the case of site-specific liposomes of quercetin, a polyphenolic compound of plant medicines, which showed antioxidant effect in two articles found; however their action promoted therapeutic improvement of different conditions. According to Sarkar et al (2006), liposomes manosides of quercetin showed some brain selectivity, with better antioxidant effects on younger than older rats. A fact proven by measurements of brain dosages of superoxide dismutase, catalase, glucose-6-phosphate dehydrogenase, glutathione reductase

and glutathione S-transferase that were higher in young rats after the procedure of ischemia/reperfusion (I/R) of the carotid artery. In general, this formulation prevented the decrease in antioxidant enzymes, helping to maintain the endogenous antioxidant defenses, as well as markedly prevented the edema formation in neuronal cells from young and old rats.

However, according to Mandal et al (2008), benefits in the hepatic metabolism were observed with liposomes, with planning of galactosides of quercetin to act specifically on the liver of rats with hepatocellular carcinoma induced by diethylnitrosamine. The intravenous administration of liposomes once a week for 16 weeks prevented the development of hepatocellular carcinoma and liver oxidative damage induced by this compound, besides improving the clinical use of quercetin, since it shows no water solubility, improving pharmacokinetics of this flavonoid. This reveals the importance of using these liposomes in the therapeutic intervention of hepatocellular carcinoma induced by diethylnitrosamine.

Also in the liver, another encapsulated flavonoid that played important antioxidant action was the conventional liposomes of lycopene (LYC-L). They were responsible for increasing the antioxidant activity in serum and liver of rats in the group receiving L-LYC. Furthermore, liposomes increased the time of lycopene absorption, increased their antioxidant potential and decreased the lipid peroxidation when compared with the group receiving free lycopene (Tian et al. 2007).

Another flavonoidal formulation that stood out with therapeutic potential against the effects produced by ischemia were conventional liposomes containing luteolin (lipLU), using I/R model by technique of the middle cerebral artery occlusion. The luteolin was isolated from the ripe fruit of *Perilla frutescens* (L.) Britt and applications of its liposomes after the I/R procedure was effective in preventing behavioral and histological changes, besides reducing the levels of reactive oxygen species after 13 days of treatment. Thus, this study indicates that the liposomes containing luteolin may have considered neuroprotective effect as

a potential to treat ischemia for reestablishing the balance of the pro-oxidant and antioxidant state (Zhao et al., 2011).

Thus, one can attest that liposomal formulations derived from flavonoids described to date have demonstrated significant antioxidants potential to the brain and liver through *in vivo* models. However, it has been found an article attesting to *in vitro* antioxidant effect of a formulation containing a beta carotenoid.

As the Astaxanthin, a carotenoid pigment with remarkable antioxidant activity, which was encapsulated in conventional liposomes in an attempt to improve the bioavailability of this substance in Hep3B and HepG2 cell lineages (hepatocellular carcinoma). Liposomes have demonstrated stability, good ability to transport and better activation of antioxidant enzymes such as superoxide dismutase, catalase and glutathione S-transferase compared with free astaxanthin. When associated with emission of gamma radiation, a potentiation can also be perceived in capturing of liposomes by HepG2 and Hep3B cells, which suggests a possible use of liposomes containing astaxanthin as adjuvant in the therapy using gamma radiation (Peng et al. 2010).

Besides the liposomes of natural origin, formulations containing synthesized substances can express significant antioxidant effect, as described in the next section.

3.2 ANTIOXIDANT ACTION OF LIPOSOMES CONTAINING SUBSTANCES OF SYNTHETIC ORIGIN

Three articles were found reporting the antioxidant potential of liposomes containing synthetic substances, such as encapsulation of Cu/Zn superoxide dismutase tempamine, catalase and superoxide dismutase.

Although the articles described above have reported the advantages of the antioxidant effect of liposomes on the brain and liver diseases, also two articles reported that antioxidant liposomes can act in the treatment of lung lesions.

Thus, Rengel et al (2005) showed that pretreatment of human lung epithelial cells (A2182) with conventional liposomes containing CuZnSOD (Cu/Zn superoxide dismutase) was efficient to protect these cells against oxidative stress. In this article liposomes with a negative charge (anionic), positively charged (cationic) and neutral charge containing all CuZnSOD were analyzed, these were responsible for increasing the cellular concentration of SOD in 108%, 85% and 83%, respectively.

Whereas McClintock et al (2006) observed the therapeutic effect of liposomes in lung lesions when observing that instillation of 2-chloroethyl sulfide acetate in successive combination with the application of pegylated liposomes of catalase and superoxide dismutase promoted a significant attenuation of the lung lesion development. Similarly, co-instillation of liposomes of reducing agents, N-acetylcysteine, resveratrol or glutathione promoted a significant reduction of acute lung injury.

Another study on a different approach, also demonstrated that the pegylated liposomes of tempamine are able to promote slow and controlled release of the compound and reach the cerebral circulation of rats providing significant therapeutic effects on treatment of experimental autoimmune encephalomyelitis. These results can be attributed to the antioxidant potential of tempamine, a type of stable piperidine nitroxide, capable of reversing the oxidative damage from reactive species derived from oxygen, elements very common in neurodegenerative diseases related to oxidative stress. Also, the pegylated liposomes besides having greater ability to reach the brain showed greater pharmacological effect than the free substance (Kizelsztejn et al., 2009).

3.3 NEUROPROTECTIVE ACTION OF LIPOSOMES CONTAINING SUBSTANCES OF NATURAL ORIGIN

Corroborating the results displayed in the topic 3.1, encapsulated natural substances play an important bearing on the treatment of diseases affecting the CNS, with all the articles reporting neuroprotective effects of flavonoidal liposomes.

This is the case of the liposomal encapsulation of quercetin, a flavonoid antioxidant action that when encapsulated in conventional liposomes favors the anxiolytic activity and cognitive in rats, so that its intranasal administration produced better results, and thus, the best means of administration for delivery of quercetin in the central nervous system (Priprem et al., 2008).

Also, liposomes containing quercetin had representative protective action against the cerebral effects caused by ischemia. Prior administration of quercetin liposomes in rats that had induced permanent focal ischemia (by occlusion of the middle cerebral artery) reduced ischemic brain damage, promoted partial reversal of motor deficits, besides significantly increase the reserve of reduced glutathione and the amount of cells in the striatum and cortex. A fact that did not happen with free quercetin, once it cannot get reach the cerebral circulation. The neuroprotection nurtured by this liposomal preparation minimized the effects of oxidative stress of fundamental importance in the lesion pathogenesis by cerebral ischemia, suggesting that this liposome is an important defense mechanism after ischemia (Rivera et al., 2008).

Another encapsulated flavonoid that also showed significant neuroprotective effect was the resveratrol, derived from *Rhizoma Et Radix Polygoni Cuspidati*, which after 14 days of application of its free and conventional liposomal forms in mice with Parkinson's Disease was responsible for decreasing the abnormal rotational behavior of animals, as well as reducing the loss and apoptosis of nigral cells; in addition to providing a reduced level of reactive oxygen species, promoting antioxidant and protective effect of dopamine neurons on

rats with Parkinson's disease, aiding in the treatment of patients with Parkinson's disease, since the oxidative stress influences in the pathogenesis of this disease for culminating in a selective loss of nigral dopaminergic neurons. However, the liposomal resveral showed better effects than the free one because of the increased bioavailability (Wang et al., 2011).

All these data once again point out the importance using liposomes as carriers for substances potentially useful for the treatment of pathologies affecting the central nervous system and are associated with oxidative stress; this same relationship can be seen in the following section.

3.4 NEUROPROTECTIVE ACTION OF LIPOSOMES CONTAINING SUBSTANCES OF SYNTHETIC ORIGIN

The lowest number of experiments found was that one relating the neuroprotective effect of encapsulated substances of synthetic origin with only two items, corroborating the scarcity of items displayed on the second topic related to the antioxidant activity of substances of synthetic origin.

Both articles reported the neuroprotective ability of liposomes for *in vitro* experiments, but with different directions. However, in one of them were performed experiments with pegylated liposomes containing a drug while in the other were carried out tests with conventional liposomes containing an antioxidant enzyme. Both experiments also differed regarding the site of action: one acted on primary cortical astrocytes of rats, but the other worked on mesencephalic neurons.

Thus, Paulino et al (2004) found that the encapsulation of idebenone in pegylated liposomes proved to be more effective than the free idebenone to neutralize the ethanol-induced damage in primary cortical astrocytes of rats (*in vitro*), being required a dose of liposomes ten times smaller than the free drug for providing such effect, this advantage is associated with the fact that this formulation increases the drug bioavailability in these cells.

Whereas Zeevalk et al (2010) testified that conventional liposomes containing reduced glutathione release this enzyme in a controlled manner, which favors the replacement and maintenance of intracellular glutathione. Very important evidence, since in many neurodegenerative diseases there are altered antioxidant defenses with reduced glutathione, in the case of Parkinson's disease there is 40 to 50% reduction of the total glutathione. After four hours of application, the liposomes restored intracellular levels of this enzyme presenting hundred times more power; besides providing safely neuroprotection to mesencephalic neurons, action proven by experiments of *in vitro* model of Parkinson's disease.

4 CONCLUSION

It was observed that the scientific production on liposomal preparations aimed at promoting antioxidant and neuroprotective effects in the last 10 years has been growing, with good results for the improvement of pharmacological activities of substances of natural and synthetic origin, with special focus on compounds isolated from plants encapsulated in conventional liposomes with promising therapeutic action on ischemic and neurodegenerative brain diseases. Thus, the hypothesis of using the nanotechnology as a tool of enormous potential to produce new therapies for the treatment and prevention of various diseases is reinforced.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors are grateful the financial support granted by the following Brazilian agencies: *Research Supporting Foundation of State of Piaui* (FAPEPI), *Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel* (CAPES) and *National Counsel of Technological and Scientific Development* (CNPq).

DECLARATION OF INTEREST

The authors report no declarations of interest.

REFERENCES

Barenholz Y.C. (2012). Doxil®—The first fda-approved nano-drug: Lessons learned. *J Control Release*, 160:117-134.

Brambilla D., Droumaguet B., Nicolas J., Hashemi S.H., Wu L.P., Moghimi S.M., Couvreur P., Andrieux K. (2011). Nanotechnologies for Alzheimer's disease: diagnosis, therapy, and safety issues. *Nanomedicine*, 7:521-40

Freitas R.L., Santos I.M., Souza G.F., Tomé A.R., Saldanha G.B., Freitas, R.M. (2010). Oxidative stress in rat hippocampus caused by pilocarpine-induced seizures is reversed by buspirone. *Brain Res Bull*, 81:505-09.

Ferreira P.B., Almeida A.A.C., Freitas R.M. (2012). Antioxidant effect of buspirone in epilepsy model induced by pilocarpine, *Rev Psiquiatr Clín*, 39:153-56.

Halliwell B. (2011). Free radicals and antioxidants - quo vadis?. *Trends Pharmacol Sci*, 32: 125-30.

Khawaja A.M. (2011). The legacy of nanotechnology: revolution and prospects in neurosurgery. *Int J Surg*, 9:608-14.

Kizelsztejn P., Ovadia H., Garbuzenko O., Sigal A., Barenholz Y. (2009). Pegylated nanoliposomes remote-loaded with the antioxidant tempamine ameliorate experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol*, 213:20-5.

Kumar, N.; Singh, N.; Jaggi, A. S. (2011). Anti-stress effects of cilnidipine and nimodipine in immobilization subjected mice. *Physiology & Behavior*, 105:1148-1155.

- Mandal A. K.; Das S.; Mitra M.; Chakrabarti R. N.; Chatterjee M.; Das, N. (2008). Vesicular flavonoid in combating diethylnitrosamine induced hepatocarcinoma in rat model. *J Exp Ther Oncol*, 7:123-33.
- Mcclintock S.D., Hoesel L.M., Das S.K., Till G.O., Neff T., Kunkel R.G., Smith M. G., Ward P.A. (2006). Attenuation of half sulfur mustard gas-induced acute lung injury in rats. *J App Toxicol*, 26:126-31.
- Modi G., Pillay V., Choonara Y.E., Ndesendo V.M., Toit L.C.D., Naidoo D. (2009). Nanotechnological applications for the treatment of neurodegenerative disorders. *Prog Neurobiol*, 88:272-85.
- Nunes A., Al-Jamal K.T., Kostarelos K. (2012). Therapeutics, imaging and toxicity of nanomaterials in the central nervous system. *J Control Release*, 161:290-306.
- Oliveira L.C.; Taveira E.J.F.; Souza L.G.; Marreto R.N.; Lima E.M.; Taveira S.F (2012). Aplicações das Nanopartículas Lipídicas no Tratamento de Tumores Sólidos: Revisão de Literatura. *Rev Bras de Cancerol*, 58:695-701.
- Paolino D., Iannone M., Cardile V., Renis M., Puglisi G., Rotiroti D., Fresta, M. (2004). Tolerability and improved protective action of idebenone-loaded pegylated liposomes on ethanol-induced injury in primary cortical astrocytes. *J Pharm Sci*, 93:1815-27.
- Peng C.H., Chang C.H., Peng R.Y., Chyau C.C. (2010). Improved membrane transport of astaxanthine by liposomal encapsulation. *Eur J Pharm Biopharm*, 75:154-61.
- Priprem A., Watanatorn J., Sutthiparinyanont S., Phachonpai W., Muchimapura S. (2008). Anxiety and cognitive effects of quercetin liposomes in rats. *Nanomedicine*, 4:70-8.
- Rengel R.G., Grčić J.F., Čepelak I., Grubišić T.Z., Barišić, K. (2005). The effect of liposomes with superoxide dismutase on A2182 cells. *Eur J Pharm Biopharm*, 60:47-51.

- Rivera F., Costa G., Abin A., Urbanavicius J., Arruti C., Casanova G., Dajas F. (2008). Reduction of ischemic brain damage and increase of glutathione by a liposomal preparation of quercetin in permanent focal ischemia in rats. *Neurotox Res*, 13:105-14.
- Sahni J.K., Doggui S., Ali J., Baboota S., Dao L., Ramassamy, C. (2011). Neurotherapeutic applications of nanoparticles in Alzheimer's disease. *J Control Release*, 152:208-31.
- Sarkar S., Das N. (2006). Mannosylated liposomal flavonoid in combating age-related ischemia–reperfusion induced oxidative damage in rat brain. *Mech Ageing Dev*, 127:391-97.
- Tian Y.Y.; Ge L.; Duan X.L.; Gao Z. Q.; Chang Y. Z. (2007). Lycopene liposomes: lycopene release in vitro and pharmaceutical behaviors and antioxidation in vivo. *Acta Pharm Sin*, 42:1107-1111.
- Wang Y., Xu H., Fu Q., Ma R., Xiang, J. (2011). Resveratrol derived from rhizoma et radix polygoni cuspidati and its liposomal form protect nigral cells of Parkinsonian rats. *Zhongguo Zhongyao Zazhi.*, 36:1060-6.
- Zeevalk G.D., Bernard L.P., Guilford F. (2010). Liposomal-glutathione provides maintenance of intracellular glutathione and neuroprotection in mesencephalic neuronal cell. *Neurochem Res*, 35:1575-87.
- Zhao G., Zang S.Y., Jiang Z.H., Chen Y.Y., Ji X.H., Lu B.F., Wu J.H., Qin G.W., Guo L.H. (2011). Postischemic administration of liposome-encapsulated luteolin prevents against ischemia-reperfusion injury in a rat middle cerebral artery occlusion model. *J Nutr Biochem*, 22:929-36.