

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS  
CURSO DE GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA

Thaís Alves Silva

**Avaliação da biodistribuição encefálica do 7-nitroindazol livre e nanoemulsionado**

Florianópolis

2022

Thaís Alves Silva

## **Avaliação da biodistribuição encefálica do 7-nitroindazol livre nanoemulsionado**

Trabalho de Conclusão de Curso submetido ao curso de graduação em Farmácia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel(a) em Farmácia.

Orientadora: Profa. Dra. Elenara Lemos Senna

Coorientadora: Dra. Angela Patricia França

Florianópolis

2022

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Silva, Thaís Alves

Avaliação da biodistribuição encefálica do 7-nitroindazol livre e nanoemulsionado / Thaís Alves Silva ; orientadora, Elenara Lemos Senna, coorientadora, Angela Patricia França, 2022.

39 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) -  
Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde, Graduação em Farmácia, Florianópolis, 2022.

Inclui referências.

1. Farmácia. 2. Nanoemulsões. 3. 7-nitroindazol. 4. Biodistribuição. I. Lemos Senna, Elenara . II. França, Angela Patricia. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Graduação em Farmácia. IV. Título.

## Avaliação da biodistribuição encefálica do 7-nitroindazol livre e nanoemulsionado

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi julgado adequado para obtenção de grau de Bacharel em Farmácia e aprovado em sua forma final pelo Curso de graduação em Farmácia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Santa Catarina.

Florianópolis, 26 de agosto de 2022.



Documento assinado digitalmente  
**Liliete Canes Souza Cordeiro**  
Data: 01/09/2022 00:38:11-0300  
CPF: 572.397.380-00  
Verifique as assinaturas em <https://v.ufsc.br>

Coordenação do Curso

### Banca examinadora



Documento assinado digitalmente  
**Elenara Maria Teixeira Lemos Senna**  
Data: 02/09/2022 17:37:17-0300  
CPF: 607.080.000-10  
Verifique as assinaturas em <https://v.ufsc.br>

Profa. Dra. Elenara Lemos Senna

Orientadora

Dra. Angela Patricia França

Coorientadora



Documento assinado digitalmente  
**Filipe Carvalho Matheus**  
Data: 01/09/2022 08:35:04-0300  
CPF: 065.130.196-30  
Verifique as assinaturas em <https://v.ufsc.br>

Prof. Dr. Filipe Carvalho Matheus (Titular)

Universidade Federal de Santa Catarina



Documento assinado digitalmente  
**FABIANA NORONHA DORNELLES**  
Data: 31/08/2022 19:42:44-0300  
CPF: 675.095.920-20  
Verifique as assinaturas em <https://v.ufsc.br>

Dra. Fabiana Noronha Dornelles (Titular)

Universidade Federal de Santa Catarina

Florianópolis, 2022.

Agradecimentos

Aos meus pais, Virgínia e Delfim, e à minha irmã, Luísa, pelo amor e apoio em todos os momentos da minha vida, sempre me incentivando a me manter firme e não perder minha essência, e por nunca medirem esforços para me ajudar.

Ao Pedro, pelo companheirismo e amor durante todos os anos de faculdade. Obrigada por ser meu maior confidente.

Aos meus amigos e parceiros de curso, Virgínia, Yasmim, Hanna, Vitória, Victória, Bruna e João, que compartilharam comigo todas as dificuldades e alegrias que a universidade pode proporcionar.

Aos meus melhores amigos de longa data, Sofia, Natália, Ana Paula, Mariana, Enrico, Lucas Taka, Matheus e Beatriz, por todas as risadas, desabafos, conselhos, fofocas, viagens e muito mais. A vida com vocês é muito melhor.

À professora Elenara e Angela, que foram minhas grandes orientadoras nos últimos dois anos, que me acolheram durante a pandemia, acreditaram no meu potencial, me ensinaram e auxiliaram muito em todo o trabalho realizado até aqui.

Aos membros da banca, Filipe, Fabiana e Lilian, por terem aceitado contribuir nesse trabalho com suas avaliações e conhecimentos.

Por fim, à Universidade Federal de Santa Catarina, aos docentes, técnicos e administradores do curso de graduação em Farmácia, por proporcionarem um ensino de qualidade e todo o espaço físico e equipamentos para realização desse trabalho.

## RESUMO

O sistema nervoso central (SNC) é responsável por controlar os principais processos cognitivos e motores, sendo os neurônios – através da liberação de neurotransmissores –, as células responsáveis por esse controle. O SNC é envolto pela barreira hematoencefálica (BHE) que atua como uma barreira protetora, e dificulta a chegada de células e xenobióticos ao encéfalo, dificultando o tratamento de doenças do sistema nervoso central. O envolvimento do óxido nítrico (NO) em processos patológicos, tais como em doenças neurodegenerativas e psiquiátricas, tem despertado interesse nas últimas décadas, especialmente devido ao seu papel em importantes processos fisiológicos, como na plasticidade sináptica e neurotransmissão. O 7-Nitroindazol (7-NI) atua como inibidor seletivo da enzima formadora de NO no SNC. Estudos demonstraram um efeito positivo no uso de 7-NI na diminuição de efeitos adversos e no tratamento de doenças do SNC. Entretanto, devido às limitações biofarmacêuticas, o uso clínico do 7-NI é dificultado. Além disso, não existem na literatura estudos avaliando a biodisponibilidade do 7-NI no SNC. Para tal, desenvolveu-se nanoemulsões lipídicas peguilladas e não peguilladas contendo 7-NI (NEPEG-7NI e NENPEG-7NI, respectivamente) pela técnica de emulsificação espontânea para administração intravenosa. O presente trabalho teve como objetivo caracterizar as nanoemulsões e avaliar a biodistribuição encefálica do 7-NI. Os resultados obtidos demonstraram a formação de dispersões coloidais nanométricas, monodispersas, com potencial zeta negativo, teor acima de  $400 \mu\text{g.mL}^{-1}$  de 7-NI e encapsulação em cerca de 70%. O estudo de biodistribuição demonstrou que o 7-NI livre e nanoemulsionado se distribui amplamente no SNC e mostrou um aumento significativo ( $p < 0,05$ ) da NENPEG-7NI no tecido estriado no tempo de 5 minutos em comparação com a NEPEG-7NI. Enquanto, no tempo de 15 minutos a NEPEG-7NI mostrou-se em quantidade superior ( $p < 0,05$ ) no bulbo olfatório em comparação com os outros grupos. A associação do 7-NI as nanoemulsões mostrou-se favorável, permitindo a entrega do fármaco a diferentes regiões do encéfalo quando administrado via intravenosa.

Palavras-chave: 7-nitroindazol; óxido nítrico; nanoemulsões; biodistribuição encefálica.

## ABSTRACT

The Central Nervous System (CNS) is responsible for the control of the main cognitive and motor process, being the neurons – through the release of neurotransmitters – the cells responsible for this control. The CNS is involved by the blood-brain barrier (BBB), that makes it difficult for cells and xenobiotics to reach the brain, including drugs that can treat CNS diseases. The role of nitric oxide (NO) in pathological process, such as neurodegenerative and psychiatric diseases, has evoked interest in recent decades, especially their role in important process, as synaptic plasticity and neurotransmission. 7-Nitroindazole (7-NI) acts as a selective inhibitor of the NO-forming enzyme in the CNS. Studies showed a positive effect of using 7-NI in the reduction of adverse effects and in the treatment of CNS diseases. However, due to biopharmaceutical characteristics of the molecule, the clinical use of 7-NI is difficult. In addition, there are no studies in the literature evaluating the bioavailability of 7-NI in the CNS. To this end, pegylated and non-pegylated lipid nanoemulsions containing 7-NI (NEPEG-7NI and NENPEG-7NI, respectively) were developed by spontaneous emulsification technique for intravenous administration. The present work aimed to characterize the nanoemulsions and evaluate the biodistribution of 7-NI in the CNS. The results showed the formation of nanometric, monodisperse colloidal dispersions with negative zeta potential, content above 400  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  of 7-NI and encapsulation capacity about 70%. The biodistribution study demonstrated that free and nanoemulsified 7-NI distributes widely in the CNS and showed a significant increase ( $p < 0.05$ ) of NENPEG-7NI in striated tissue within 5 minutes compared to NEPEG-7NI. While, in the 15-minute time, NEPEG-7NI showed a higher amount ( $p < 0.05$ ) in the olfactory bulb compared to the other groups. The association of 7-NI with nanoemulsions proved to be favorable, allowing the drug to be delivered to different regions of the brain when administered intravenously.

**Keywords:** 7-Nitroindazole; Nitric oxide; Nanoemulsions; Biodistribution.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Vista lateral do encéfalo representando algumas estruturas principais.....	12
FIGURA 2 – Desenho sistemático da barreira hematoencefálica em uma seção transversa mostrando o endotélio, membrana basal, pericitos, astrócitos e junções apertadas.....	13
FIGURA 3 – Representação da sinapse. (1) Vesícula sináptica carregada de neurotransmissores; (2) estímulo da despolarização da membrana levando ao influxo de $Ca^{2+}$ através dos canais de cálcio dependentes de voltagem; (3) liberação dos neurotransmissores na fenda sináptica; (4) processo de reciclagem de neurotransmissores por endocitose.....	16
FIGURA 4 – Ação dos neurotransmissores em receptores acoplados a proteína G levando à (a) abertura de canais iônicos; (b) ativação de enzimas que formam segundo mensageiros intracelulares.....	17
FIGURA 5 – Estrutura química do 7-nitroindazol.....	19
FIGURA 6 – Estrutura de nanoemulsões óleo em água (O/W) e água em óleo (W/O).....	21
FIGURA 7 – Obtenção de nanoemulsões por emulsificação espontânea.....	22
FIGURA 8 – Avaliação da biodistribuição encefálica do 7-NI entre os tecidos do sistema nervoso central após a administração intravenosa do 7-NI livre, e das nanoemulsões não peguilada e peguilada contendo 7-NI em ratos na dose de $10\text{ mg.kg}^{-1}$ . (a) Comparação entre os tecidos após 5 minutos da administração intravenosa. (b) Comparação entre os tecidos após 15 minutos da administração intravenosa. (c) Comparação entre os tecidos após 30 minutos da administração intravenosa.....	33



## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Classificação das células do sistema nervoso.....	15
TABELA 2 – Caracterização química e físico-química das nanoemulsões peguiladas e não-peguiladas contendo 7-NI (n=3).....	31
TABELA 3 – Resultados obtidos na avaliação da biodistribuição encefálica do 7-NI após administração intravenosa do 7-NI livre, e das nanoemulsões não peguilada (NENPEG-7NI) e peguilada contendo 7-NI (NEPEG-7NI) em ratos na dose de 10 mg.kg <sup>-1</sup> .....	32

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

7-NI – 7-Nitroindazol

BHE – Barreira Hematoencefálica

BSLCR – Barreira Sangue - Líquido Cefalorraquidiano

BSA – Barreira Sangue-Aracnóide

Cdk5 – Quinase Ciclina-Dependente

cGMP – Monofostato de Guanosina Cíclico

GABA – Ácido Gama-Aminobutírico

IFN- $\gamma$  - Interferon-gama

L-DOPA - Levodopa

LPS - Lipopolissacarídeo

NE - Nanoemulsão

NMDA – N-metil D-aspartato

NO – Óxido Nítrico

NOS – Óxido Nítrico Sintase

sGC – Guanilato Ciclase solúvel

SN – Sistema Nervoso

SNC – Sistema Nervoso Central

SNP – Sistema Nervoso Periférico

TNF- $\alpha$  - Fator de Necrose Tumoral Alfa

## SUMÁRIO

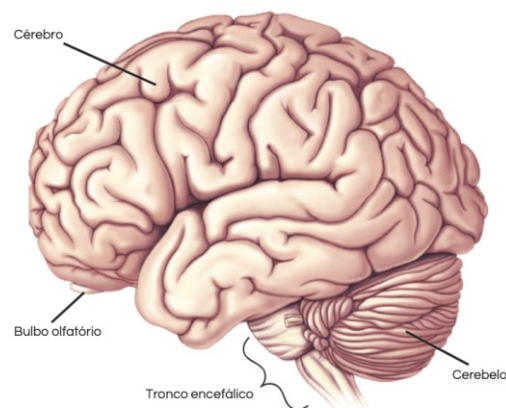
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	12
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	24
2.1	OBJETIVO GERAL.....	24
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	24
<b>3</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	25
3.1	MATERIAIS.....	25
3.2	METODOLOGIA EMPREGADA .....	25
3.2.1	<b>Preparação da solução de 7-nitroindazol (fármaco livre) para os estudos de biodistribuição encefálica</b> .....	25
3.2.2	<b>Preparação das nanoemulsões pela técnica de emulsificação espontânea</b> .....	25
3.2.3	<b>Determinação do diâmetro médio da gotícula, índice de polidispersão e potencial zeta</b> .....	26
3.2.4	<b>Avaliação do teor e eficiência de encapsulação</b> .....	27
3.2.5	<b>Avaliação do perfil de biodistribuição encefálica do 7-nitroindazol após administração intravenosa do fármaco livre e associado às nanoemulsões</b> .....	28
3.2.5.1	Animais.....	28
3.2.5.2	Avaliação do perfil de biodistribuição encefálica in vivo do 7-nitroindazol após administração intravenosa do fármaco livre e associado às nanoemulsões.....	28
3.2.5.3	Metodologia analítica de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para quantificação do 7-nitroindazol em tecido animal .....	29
3.2.5.4	Preparação das amostras de estruturas encefálicas para análise de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....	30
3.2.5.5	Análise estatística .....	30
<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	30
4.1	PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DAS NANOEMULSÕES.....	31
4.2	AVALIAÇÃO DO PERFIL DE BIODISTRIBUIÇÃO ENCEFÁLICA DO 7-NITROINDAZOL LIVRE E NANOEMULSIONADO.....	31
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	34
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	36
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	37

## 1. INTRODUÇÃO

O sistema nervoso (SN) é único, em relação à vasta complexidade dos processos cognitivos e das ações de controle que pode executar. Ele recebe, a cada minuto literalmente milhões de bits de informação provenientes de diferentes órgãos e nervos sensoriais e então os integra para determinar as respostas a serem executadas pelo corpo (HALL; GUYTON, 2011). O sistema nervoso dos animais vertebrados é frequentemente dividido em sistema nervoso central (SNC) e sistema nervoso periférico (SNP). O sistema nervoso central consiste no encéfalo e na espinha dorsal. O SNP consiste em todos os outros nervos e neurônios que não possuem vínculo com o SNC.

O cérebro humano é responsável pelas respostas, sensações, movimentos, emoções, comunicação, pensamentos e memória. É protegido pelo crânio, as meninges e o líquido cerebrospinal, ou liquor. O encéfalo é dividido entre o cérebro, o cerebelo e o tronco encefálico (Figura 1). A região mais externa do encéfalo é composta pela substância cinzenta, também conhecida como córtex cerebral, é preenchida por bilhões de neurônios, células da glia e capilares. É o principal componente do SNC, dividido entre os lobos: a) frontal, responsável pelos movimentos voluntários, resolução de problemas, atenção, memória linguagem; b) parietal, responsável pelo processamento de informações sensoriais; c) occipital, recebe, processa e interpreta as informações visuais captadas pela retina; e d) temporal, recebe e processa os estímulos auditivos pelos diferentes sulcos. Já a substância branca, região mais interna do cérebro ou subcortical, é composta principalmente por axônios mielinizados, auxiliando na troca de informações e comunicação de diferentes áreas da substância cinzenta (THAU; REDDY; SINGH, 2022).

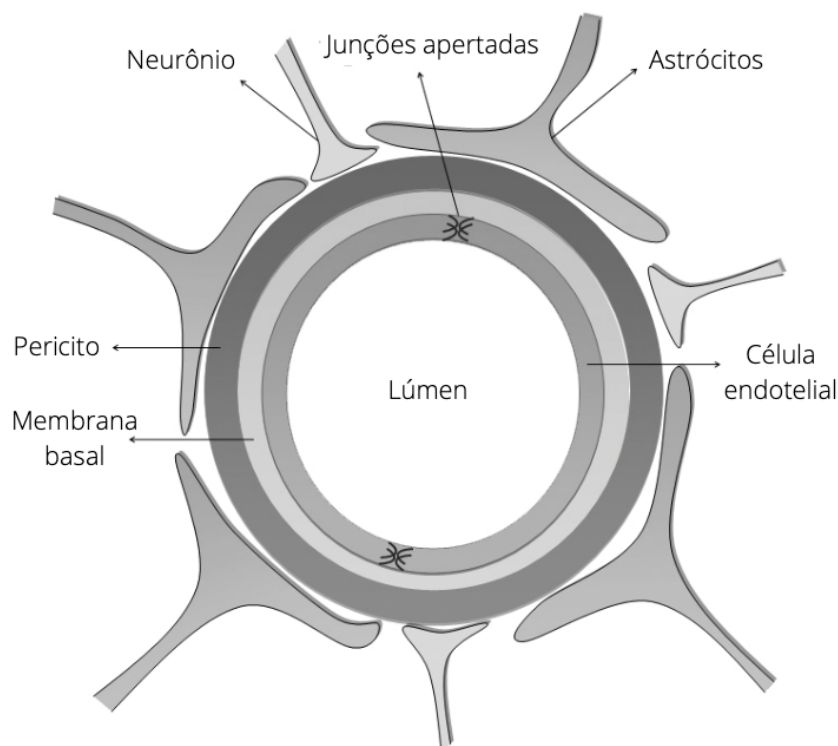
**Figura 1.** Vista lateral do encéfalo representando algumas estruturas principais.



Adaptado de Bear et al., 2016.

O sistema nervoso central (SNC) é uma região protegida por três elementos estruturais responsáveis pela regulação da homeostase: a barreira hematoencefálica (BHE) com a interface entre o encéfalo e os vasos sanguíneos; a barreira sangue - líquido cefalorraquidiano (BSLCR), formada pelo plexo coróide e a membrana aracnóide com os vasos sanguíneos e o líquido cefalorraquidiano; e a barreira sangue-aracnóide (BSA), que é a interface dos vasos sanguíneos com a camada do epitélio da aracnóide subjacente a dura-máter das meninges. A BHE é uma barreira altamente especializada que limita a entrada de substâncias potencialmente tóxicas ao SNC, sendo formada pela presença das junções endoteliais que controlam a abertura e fechamento coordenada das junções célula-célula. Estas junções são compostas de diferentes complexos multi-proteicos, como as junções apertadas e as junções endoteliais aderentes que são os principais reguladores da permeabilidade celular (ROJAS; RITTER; DAL PIZZOL, 2011). Além das células endoteliais dos capilares, outras células com perícitos, astrócitos e células neuronais também desempenham um papel importante na diferenciação e manutenção da BHE, intervindo na sua permeabilidade (Figura 2). As células endoteliais também estão cobertas por uma membrana basal e uma matriz extracelular, e apresentam carga superficial negativa que repelem compostos carregados negativamente (LOCH-NECKEL; KOEPP, 2010).

**Figura 2.** Desenho sistemático da barreira hematoencefálica em uma seção transversa mostrando o endotélio, membrana basal, perícitos, astrócitos e junções apertadas.



Adaptado de Loch-Neckel et al. (2010).

A impermeabilidade da BHE é o resultado de uma série de características únicas, que acrescenta dificuldade à entrada de moléculas no SNC. Além das características do endotélio que foram os capilares sanguíneos, há a presença de um grande número de enzimas degradantes no interior do mesmo de modo que, com exceção de água, gases como oxigênio e o dióxido de carbono e determinadas moléculas lipossolúveis muito pequenas podem passar de forma íntegra. Moléculas hidrofílicas essenciais para o metabolismo do cérebro, tais como íons, glicose, aminoácidos e componentes de ácido nucléico, passam pela BHE através de canais especializados. O transporte de moléculas hidrofílicas, tais como peptídeos e proteínas que não têm um sistema de transporte específico é mais lento do que de moléculas lipofílicas, no entanto, atravessam a BHE em quantidades suficientes para causar um efeito mediado por receptores nos neurônios. Alguns tipos especiais de proteínas ou peptídeos como, por exemplo, hormônios periféricos e peptídeos regulatórios que exercem sua ação no cérebro geralmente têm sistemas especializados de transporte saturável em toda a BHE. Desta forma a BHE se torna altamente restritiva, mas, de qualquer forma, pode ser incapaz de impedir a passagem de algumas toxinas e agentes terapêuticos da corrente sanguínea para o cérebro (ROJAS; RITTER; DAL PIZZOL, 2011).

O sistema nervoso contém cerca de 300 bilhões de células, as quais podem ser classificadas em inumeráveis tipos. No entanto, as duas classes principais são os neurônios e as células da neuroglia. O neurônio é a principal unidade de comunicação no sistema nervoso, transferindo informação entre cada célula do SNC e outras células do SNP. Esta rede de células interconectadas forma um complexo circuito suportado pelas células gliais, as quais exercem um papel importante na manutenção dos neurônios (KNOTT; MOLNAR, 2001).

Estima-se que o sistema nervoso seja composto por mais de 100 bilhões de neurônios, os quais apresentam muitos tamanhos, comprimentos, formatos e localizações diferentes que determinam suas funções (Tabela 1). Todos os neurônios apresentam um corpo celular organizado para receber informações (sinais aferentes) por meio de seus dendritos e para enviar as informações (sinais eferentes) a outros neurônios por meio de um axônio único que possui diversas ramificações, formando terminações pré-sinápticas durante o percurso até o término do axônio, seja no sistema nervoso ou no restante do organismo (HALL, GUYTON, 2011; STAHL, 2013).

Tabela1. Classificação das células do sistema nervoso.

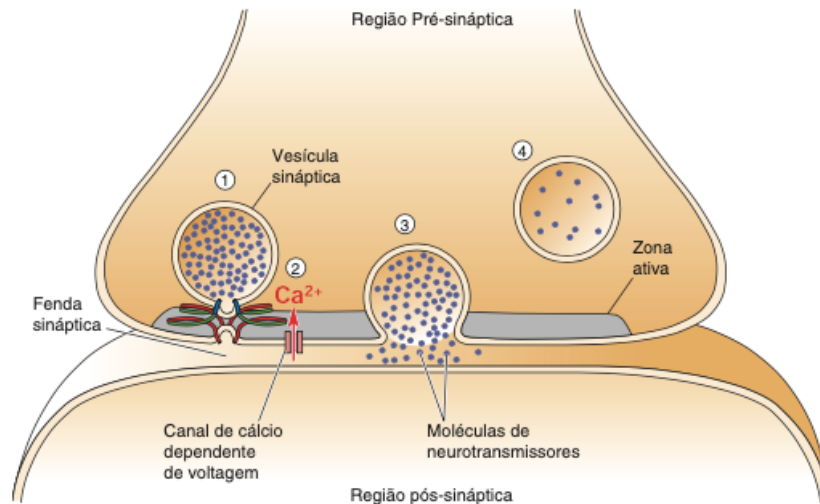
<b>Identidade estrutural</b>	<b>Neurônios</b>	<b>Glia</b>
<b>Morfologia (tamanho e formato)</b>	<p>Multipolares: neurônios com mais de dois processos celulares, sendo um axônio e os demais sendo dendritos;</p> <p>Bipolares: neurônios com um dendrito e um axônio;</p> <p>Pseudounipolar: neurônios com apenas um processo celular que se divide em dois ramos, formando um “T” – um dos ramos se estende para o SNP e outro para o SNC;</p> <p>Unipolar: neurônio com apenas um processo celular.</p>	<p>Macroglia: astrócitos, oligodendrócitos, ependimócitos;</p> <p>Microglia: células fagocíticas derivadas de macrófagos.</p>
<b>Resposta provocada por sua ativação</b>	<p>Neurônio excitatório: despolariza a membrana das células que tem contato;</p> <p>Neurônio inibitório: hiperpolariza a membrana das células que tem contato.</p>	
<b>Função</b>	<p>Neurônio motor: controla órgãos efetores (músculos e glândulas) ou fibras musculares;</p> <p>Neurônio sensorial: percepção e progressão do estímulo;</p> <p>Interneurônio: forma conexões entre os neurônios;</p>	
<b>Localização:</b>	<p>Central: no cérebro ou medula espinhal;</p> <p>Periférico: fibras nervosas e grupos celulares (gânglios) fora do cérebro e da medula espinhal.</p>	

Fonte: Knott et al. (2001).

A transmissão de informações, chamada de sinapse (Figura 3), inicia-se pelo envio de impulsos elétricos através dos axônios do neurônio pré-sináptico. No final do axônio são liberadas as moléculas de neurotransmissores, que exercem sua função no momento de ligação em seus respectivos receptores, presentes na membrana dos dendritos e corpo celular do neurônio pós-sináptico. A neurotransmissão prossegue na conversão da sinalização química em um novo impulso elétrico no neurônio pós-sináptico, gerado através da abertura dos canais de sódio dependentes de voltagem, com a entrada dos íons  $\text{Na}^+$  para o interior da célula (HALL; GUYTON, 2011). A maioria das sinapses ocorre por um sinal que se propaga na direção anterógrada, do axônio de um neurônio pré-sináptico para os dendritos localizados nos neurônios seguintes. Entretanto, em situações especiais, os neurônios pós-sinápticos podem gerar uma neurotransmissão retrógrada, como na formação e liberação de endocanabinóides e

óxido nítrico (NO), que interagem com alvos sensíveis ao cGMP do neurônio pré-sináptico, atuando na forma de resposta ao sinal anterior (HALL; GUYTON, 2011; STAHL, 2013).

**Figura 3.** Representação da sinapse. (1) Vesícula sináptica carregada de neurotransmissores; (2) estímulo da despolarização da membrana levando ao influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  através dos canais de cálcio dependentes de voltagem; (3) liberação dos neurotransmissores na fenda sináptica; (4) processo de reciclagem de neurotransmissores por endocitose.

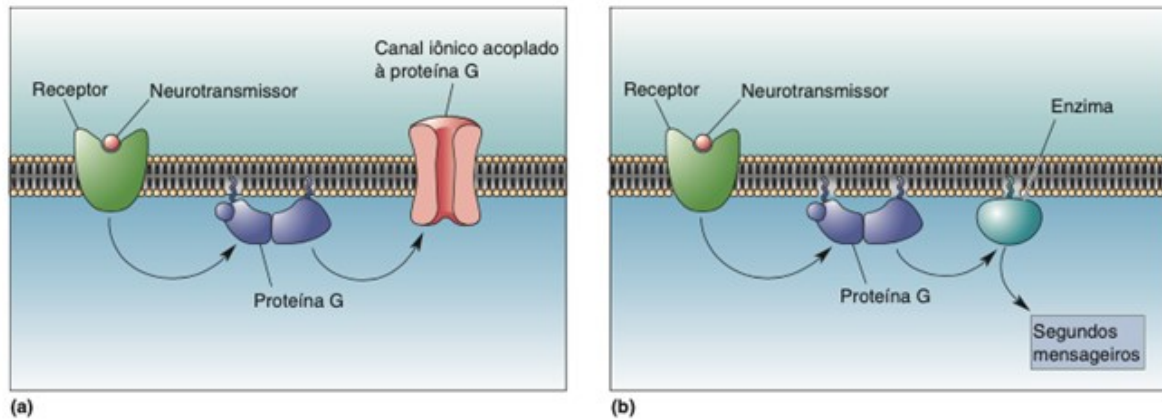


Adaptado de Bear et al., 2016.

A fenda sináptica é representada pela área de separação entre os terminais dos axônios pré-sinápticos e corpo celular do neurônio pós-sináptico (Figura 3). No término do axônio estão presentes as vesículas que contêm os neurotransmissores e mitocôndrias que fornecem ATP (trifosfato adenosina) para sintetizar novas moléculas de neurotransmissor. A despolarização da membrana promove a abertura dos canais de cálcio dependentes de voltagem, permitindo o influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  para o terminal pré-sináptico, que se ligam às proteínas na superfície interna da membrana pré-sináptica e promovem a abertura de sítios de liberação através da membrana, permitindo a liberação do conteúdo de vesículas na fenda sináptica de forma proporcional ao número de íons  $\text{Ca}^{2+}$  que entraram na célula. Após a ligação do neurotransmissor ao seu receptor, ocorre o primeiro sinal que se traduz em cascatas de transdução, ativando a produção, ativação ou aumento de um segundo mensageiro químico (Figura 4), como enzimas quinase e/ou fosfatase, que, por sua vez, ativa um terceiro mensageiro, que promove a adição e a remoção de grupos fosfato da molécula de fosfoproteínas (quarto mensageiro), respectivamente (HALL; GUYTON, 2011; STAHL, 2013).



**Figura 4.** Ação dos neurotransmissores em receptores acoplados a proteína G levando à (a) abertura de canais iônicos; (b) ativação de enzimas que formam segundo mensageiros intracelulares.



Adaptado de Bear et al., 2016.

Entre os neurotransmissores do SNC, está o óxido nítrico (NO), molécula altamente reativa associada a uma variedade de processos fisiológicos e bioquímicos. No organismo, tem como precursor a L-arginina, e sua produção é catalisada por três isoformas da óxido nítrico sintase (NOS): endotelial (NOS-3), pelo endotélio vascular do sistema cardiovascular; neuronal (NOS-1), que produz NO como neurotransmissor; e induzida (NOS-2), produzida por várias células e tem sua expressão induzida por citocinas, como interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) e fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), e por produtos bacterianos, como o lipopolissacarídeo (LPS) (KLEINERT et al., 2004; MIAN et al., 2013). Ambas as formas do NOS cálcio-dependentes (NOS-3 e NOS-1) têm atividades transitórias e assim estão presentes em concentrações relativamente baixas, enquanto a NOS-2, ativada por citocinas, é de longa duração e gera maiores concentrações de NO (MIAN et al., 2013).

A NOS-1 é considerada a principal fonte de NO dos neurônios, encontrando-se amplamente distribuída pelo sistema nervoso central e periférico (GOTTI et al., 2005). A NOS-1 atua predominantemente na amígdala, hipocampo, córtex cerebral, bulbo olfatório, corpo estriado, tálamo e no cerebelo, mas está também presente nos músculos esqueléticos, cardíaco e liso, bem como nas células da mácula densa e ilhotas pancreáticas (FÖRSTERMANN & SESSA, 2012).

Tendo em vista sua localização, o NO proveniente da isoforma neuronal está envolvido em importantes processos fisiológicos no SNC. A sua formação ocorre pela ativação do receptor NMDA pelo glutamato e outros agonistas, induzindo a atividade da NOS-1 através do influxo

intracelular de  $\text{Ca}^{++}$  (SZABÓ, 1996; PICÓN-PAGÈS; GARCIA-BUENDIA; MUÑOZ, 2019). Diferentemente dos neurotransmissores usuais, o NO não é armazenado no interior do neurônio por algum tipo de vesícula, fazendo com que não seja necessária a despolarização da membrana para que ocorra a sua liberação. Além disso, possui a capacidade de permear as membranas celulares por difusão em meio aquoso e lipídico e não precisa se ligar a receptores específicos (SZABÓ, 1996; COSSENZA et al., 2014).

O NO tem papel na neurotransmissão central, estimulando a liberação de acetilcolina de neurônios glutamatérgicos, noradrenalina, dopamina, serotonina e GABA em diversas regiões cerebrais (BANACH et al., 2011). O NO apresenta diferentes funções no SNC, atuando especialmente na plasticidade sináptica e neurotransmissão. No músculo esquelético, por exemplo, atua na dilatação de vasos sanguíneos, permitindo o aumento da irrigação muscular para contração adequada, e no retículo sarcoplasmático cardíaco participa da regulação autócrina da contratilidade cardíaca, entre outras (GOVERS; OESS, 2004). Assim, entende-se que o desbalanço na produção do NO pela NOS-1 contribui para o desenvolvimento de processos patológicos neurológicos (GOCAN et al., 2000).

O NO pode ser liberado pelas terminações pré e pós-sinápticas. No primeiro caso, o NO se liga ao grupo heme da guanilato ciclase solúvel (sGC) ativando-a e induzindo a produção de monofostato de guanosina cíclico (cGMP), que modulam a atividade de proteínas quinase G e fosfodiesterases, atuando como um neuromodulador da transmissão excitatória, provocando uma potencialização a longo prazo, agindo, assim, no aprendizado e na formação de memórias. Quando liberado como neurotransmissor anterógrado, o NO auxilia controle da motilidade gastrointestinal no sistema nervoso entérico e a transmissão da dor na medula espinhal (PICÓN-PAGÈS; GARCIA-BUENDIA; MUÑOZ, 2019).

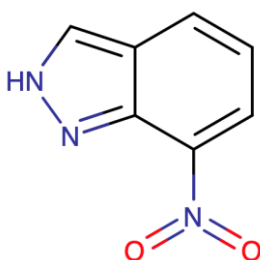
Outro efeito do NO é a promoção de reações de S-nitrosilação em diversas proteínas, geralmente em resíduos de cisteína, em que o NO se liga ao grupamento tiol, acarretando alterações da função proteica. É o caso da modificação da enzima E3 ubiquitina-ligase, que contribui para a formação dos corpos de Lewy e perda neuronal típicos da doença de Parkinson. A nitrosilação na quinase ciclina-dependente (Cdk5) contribui para a formação da proteína beta-amiloide, que está envolvida na patogênese da doença de Alzheimer. O NO também é capaz de reagir com espécies reativas de oxigênio como o ânion superóxido ( $\text{O}^{2-}$ ) na formação do peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ). Ademais, tem capacidade de formar outras espécies reativas de nitrogênio como nitritos ( $\text{NO}^{2-}$ ) e nitratos ( $\text{NO}^{3-}$ ) (COSSENZA et al., 2014; PANTHI; MANANDHAR; GAUTAM, 2018). Essas espécies reativas de nitrogênio afetam irreversivelmente a função fisiológica de lipídios, proteínas e ácidos nucleicos pela reação de

nitração, alterando vias de sinalização, proteção, metabolismo e estruturas celulares (PICÓN-PAGÈS; GARCIA-BUENDIA; MUÑOZ, 2019). O peroxinitrito pode modificar e quebrar fitas de DNA e inibir a enzima DNA ligase, induzindo um alto consumo de ATP e um rápido decaimento do nível de energia celular, que se for severo e prolongado pode levar a morte celular (EBADI; SHARMA, 2003; PICÓN-PAGÈS; GARCIA-BUENDIA; MUÑOZ, 2019).

Conforme discutido por Nunes e Laranjinha (2021), o estresse nitro oxidativo, em conjunto com aumento de dopamina e seus metabólitos no citoplasma celular, levam à disfunção mitocondrial, que pode estar intimamente associada a eventos neurodegenerativos, como os que ocorrem na doença de Parkinson. Essa relação é relevante pela expressão exagerada da NOS-1 no cérebro dos pacientes dessa patologia, demonstrada pela prevenção da degeneração e morte de neurônios dopaminérgicos por inibidores da enzima NOS-1 em modelos animais. Em outra situação, de acordo com Banach et al. (2011), o NO está associado ao desbalanço entre os sistemas excitatórios e inibitórios dos neurônios glutamatérgicos e gabaérgicos em episódios de epilepsia, conforme observado em modelos animais em que se utilizam moléculas inibitórias da NOS para avaliar a atividade convulsivante do NO.

O 7-nitroindazol (7-NI) (Figura 5) é uma substância conhecida por sua capacidade de inibir seletivamente a enzima óxido nítrico sintase neuronal (NOS-1). O 7-NI é uma pequena molécula heterocíclica que contém um anel indazol e um grupamento nitro na posição 7 (Figura 5). Age como inibidor seletivo in vivo da NOS-1 ao ligar-se reversivelmente ao grupo heme desta enzima, impedindo a ligação do cofator BH<sub>4</sub> (BUSH & POLLACK, 2000) e competindo com a L-arginina (KLATT et al., 1994). O composto possui características lipofílicas e sua seletividade para a NOS-1 é demonstrada pela sua ineficácia em alterar o relaxamento dependente de endotélio em vasos sanguíneos isolados e em alterar a pressão arterial de ratos anestesiados, evento dependente da NOS-3 (BABBEDGE et al., 1993; MOORE, 1993).

**Figura 5.** Estrutura química do 7-nitroindazol.



Fonte: DrugBank (2020).

Em um estudo realizado em modelo animal da doença de Parkinson, Bortolanza et al. (2016) avaliaram o efeito de diferentes doses de 7-NI nas discinesias induzidas pelo tratamento de L-DOPA. A administração intraperitoneal da dose de 30 mg.kg<sup>-1</sup> de 7-NI levou a uma redução de 95% no *score* de movimentos involuntários anormais quando comparado ao grupo tratado apenas com veículo. No mesmo estudo, foi avaliada a administração de 7-NI na dose de 20 mg.kg<sup>-1</sup> em conjunto com a amantadina na dose de 10 mg.kg<sup>-1</sup>, um antagonista não competitivo dos receptores do tipo NMDA usado na clínica no tratamento de pacientes com discinesia induzida por L-DOPA. Os resultados obtidos mostraram uma redução significativa (de aproximadamente 90%) nos efeitos das discinesias no uso de amantadina em conjunto com 7-NI quando comparado o veículo, ou com os dois compostos administrados individualmente, nas mesmas doses. O estudo demonstrou a capacidade do 7-NI em diminuir a severidade de discinesias sem afetar o efeito terapêutico da L-DOPA. Um efeito sinérgico foi observado na redução do *score* utilizado com a co-administração de doses sub-efetivas de amantadina (10 mg.kg<sup>-1</sup>) e 7-NI (20 mg.kg<sup>-1</sup>), em comparação com o efeito obtido individualmente para estes compostos das mesmas doses, além de promover um efeito terapêutico superior ao da amantidina na dose de 40 mg.kg<sup>-1</sup>, com redução dos efeitos adversos.

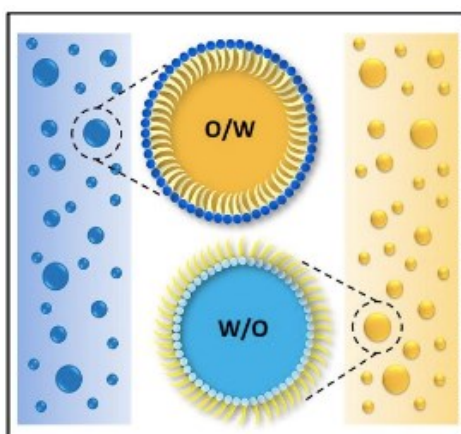
Em outro estudo, foram avaliados os efeitos o 7-NI no dano oxidativo, avaliando os metabólitos de NO, fator neurotrófico derivado do cérebro e comprometimentos de memórias em ratos Wistar jovens com hipotireoidismo. Mudanças nos níveis de hormônios da tireoide podem modular a produção de espécies reativas de oxigênio, induzindo o estresse oxidativo no cérebro, e conseqüentemente, levando ao aumento dos níveis dos metabólitos de NO que atuam na perda de memória. O estudo mostrou que o uso de 7-NI levou a melhora no aprendizado e na memória acompanhado com redução dos níveis de metabólitos do NO e um aumento nos níveis do fator neurotrófico derivado do cérebro no hipocampo dos animais. Tal fator neurotrófico pode ser detectado em diferentes áreas do cérebro de humanos e ratos, como hipocampo, amígdala, cerebelo e córtex cerebral, e está relacionado com a neuroplasticidade, incluindo neurogenese, potencialização a longo prazo e mudanças de humor. O tratamento com o fator neurotrófico resultou na redução da perda da substância nigra de neurônios dopaminérgicos. O NO é sintetizado pela tireoide pela NOS, e tem relação com a secreção dos hormônios T4 e T3. Assim o 7-NI apresenta efeito potencial na melhora da função da glândula tireoide, exercendo efeito protetivo contra os danos oxidativos no cérebro e comprometimentos na memória e aprendizado causados pelo hipotireoidismo (MEMARPOUR et al., 2020).

Entretanto, a molécula de 7-NI apresenta limitações biofarmacêuticas, como baixa solubilidade aquosa e curto tempo de meia vida plasmática. Em estudos de farmacocinética,

Bush e Pollack (2000) mostraram que a administração do 7-NI, previamente dissolvido em óleo de amendoim, pela via intraperitoneal na dose de  $50 \text{ mg.kg}^{-1}$  em ratos, levou à obtenção de um perfil plasmático em que a área sobre a curva foi cerca de 30 vezes maior que aquela obtida após a administração de uma dose de  $10 \text{ mg.kg}^{-1}$ , mostrando um perfil dose-dependente. Entretanto, o tempo de meia vida deste composto mostrou ser 3 vezes maior na maior dose, variando de 25 a 87 minutos. Assim, o tempo de meia vida deste composto pode ser considerado baixo, mesmo após a administração de uma dose alta, não ultrapassando duas horas.

Assim, considerando as limitações de baixa solubilidade aquosa e curto tempo de meia vida plasmática do 7-NI, um inibidor seletivo da NOS-1, o desenvolvimento de nanoemulsões (NEs) contendo 7-NI para administração intravenosa foi previamente realizado (BARP et al., 2018). Nanoemulsões são dispersões coloidais cineticamente estáveis constituídas de duas fases líquidas imiscíveis e com tamanho de gota de algumas dezenas a algumas centenas de nanômetros (ALMEIDA et al., 2008; HIPALGAONKAR et al., 2010; LOVELYN & ATTAMA, 2011). Dependendo da proporção dos constituintes, as nanoemulsões podem ser dispersões óleo em água (O/A) ou água em óleo (A/O), ou ainda múltiplas (A/O/A), podendo dessa forma veicular fármacos hidrofílicos e lipofílicos. Considerando que a maioria dos compostos ativos em desenvolvimento ou já disponíveis no mercado apresentam baixa solubilidade em água, as NEs do tipo O/A (Figura 6) têm sido alvo da maioria dos estudos envolvendo a liberação de fármacos (PENGON et al., 2018; SHAKER et al., 2019).

**Figura 6.** Estrutura de nanoemulsões óleo em água (O/W) e água em óleo (W/O).



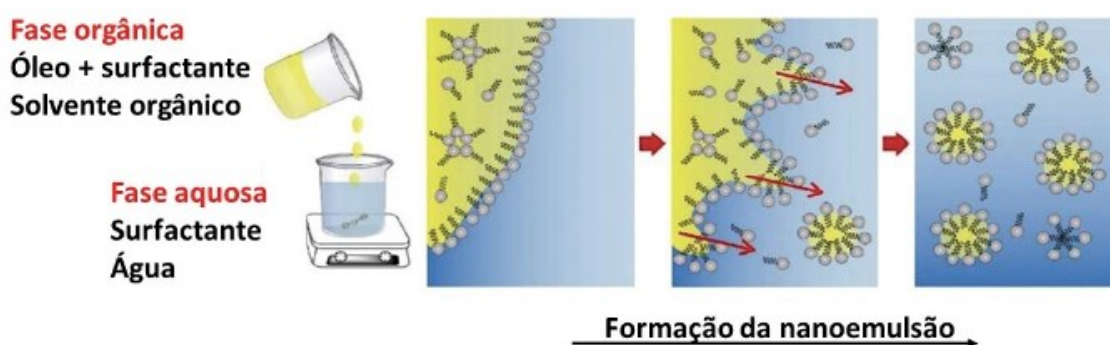
Adaptado de Singh et al., 2017.

As nanoemulsões podem ser preparadas por métodos que utilizam baixa energia, como a emulsificação espontânea, ou que utilizam alta energia, os quais requerem equipamentos que conduzam à ruptura da fase oleosa em finas gotículas e mistura de ambas as

fases oleosa e aquosa. Uma das principais características dos métodos de baixa energia é a utilização de energia armazenada no sistema para produzir as gotículas. São levados em conta as propriedades dos surfactantes, óleo e fase aquosa que formam espontaneamente a NE com base em procedimentos simples de mistura ou alterações das condições do sistema (SINGH et al., 2017).

A técnica de emulsificação espontânea é baseada na dispersão de uma fase orgânica em uma fase aquosa, com posterior evaporação dos solventes e redução do volume sob pressão reduzida (Figura 7). A fase orgânica é composta geralmente por óleo e um solvente miscível em água como acetona ou etanol, contendo ou não um surfactante lipofílico. Na fase aquosa são adicionados os componentes hidrofílicos da formulação, se assim houver, tais como surfactantes, conservantes, agente isotonzantes e outros. Após a homogeneização isolada dessas fases, a fase orgânica é injetada na fase aquosa sob agitação magnética constante. A rápida difusão do solvente orgânico na fase aquosa leva a uma turbulência interfacial (efeito Maragoni) que resulta na redução da tensão interfacial e na formação de gotas de tamanho reduzido, formando instantaneamente a nanoemulsão. A agitação magnética é mantida por determinado tempo, permitindo que o sistema atinja o equilíbrio. Só depois o solvente orgânico é removido e a formulação concentrada até o volume desejado por evaporação sob pressão reduzida (AZMI et al., 2019; RAI et al., 2018).

**Figura 7.** Obtenção de nanoemulsões por emulsificação espontânea.



Adaptado de Li et al., 2020.

Nanoemulsões convencionais (não peguadas) contendo 7-NI (NENPEG-7NI) foram obtidas pela técnica de emulsificação espontânea, conforme descrito acima. Ainda, visando o alterar as características de superfície e, assim, o perfil de biodistribuição de fármacos

incorporados, nanoemulsões peguiladas (NEPEG-7NI) foram obtidas pela incorporação de fosfolípidios anfifílicos às formulações, como o 1,2-diésteroil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-metoxi-poli(etileno)glicol. A peguilação, ou seja, a introdução de cadeias de poli(etileno)glicol na superfície das partículas, permite aumentar a estabilidade dos nanocarreadores em meio fisiológico, assim como o tempo de circulação plasmática, ao evitar o reconhecimento e a captura das partículas pelas células fagocíticas, proporcionando, portanto, melhorias na eficácia terapêutica de fármacos encapsulados (DEVALAPALLY et al., 2015). De fato, estudos farmacocinéticos realizados no nosso grupo de pesquisa mostraram que as nanoemulsões peguiladas levam ao aumento do tempo de meia vida do 7-NI, assim como o aumento dos parâmetros farmacocinéticos de C<sub>max</sub> (concentração no pico) e ASC (área sob a curva do perfil plasmático), quando comparado ao fármaco livre e à nanoemulsão não peguilada (dados ainda não publicados). Considerando a relevância do NO em patologias neurológicas, o presente trabalho teve com o intuito avaliar e comparar a distribuição encefálica do 7-NI após administração intravenosa na forma livre e após incorporação em nanoemulsões não peguiladas e peguiladas. Cabe ressaltar que este estudo é parte de um projeto que visa avaliar o potencial terapêutico do 7-NI no tratamento da sepse. No entanto, considerando os efeitos benéficos que este composto apresenta no SNC, pretendemos aqui investigar o quanto deste fármaco alcança as estruturas encefálicas e se há diferença com a sua administração na forma livre e nanoemulsionada.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a distribuição encefálica *in vivo* de 7-nitroindazol livre e associado às nanoemulsões peguiladas e não peguiladas após administração intravenosa em ratos.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Preparar nanoemulsões peguiladas e não peguiladas contendo o 7-nitroindazol, empregando a técnica de emulsificação espontânea;
- b) Caracterizar as nanoemulsões quanto as suas características de tamanho, potencial zeta, teor e eficiência de encapsulação;
- c) Determinar a concentração do 7-nitroindazol nas diferentes estruturas encefálicas, após administração intravenosa em ratos, empregando metodologia de cromatografia líquida de alta eficiência previamente desenvolvida e validada;
- d) Avaliar e comparar a distribuição encefálica do 7-nitroindazol livre e nanoemulsionado após administração intravenosa em ratos.



### **3 MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1 MATERIAIS**

O 7-NI foi adquirido da Merck (EUA), o óleo de rícino e o polissorbato 80 (Tween® 80) foram adquiridos da Sigma-Aldrich (EUA). A lecitina de soja hidrogenada (Lipoid S100) foi adquirida da Lipoid GmbH (Alemanha). O DSPE-PEG2000 (Lipoid PE 18:0/18:0 – PEG 2000) foi adquirido da Lipid Ingredients (Ribeirão Preto, Brasil). A acetonitrila grau CLAE foi adquirida da Navelab (Brasil). A água ultrapura foi obtida pelo sistema de purificação Milli-Q (Millipore, EUA). Os demais solventes e reagentes empregados foram de grau PA e foram utilizados conforme recebidos.

#### **3.2 METODOLOGIA EMPREGADA**

##### **3.2.1 Preparação da solução de 7-nitroindazol (fármaco livre) para os estudos de biodistribuição encefálica**

Para avaliação do 7-NI livre, preparou-se uma solução de 7-NI  $650 \text{ mg.mL}^{-1}$  a partir da mistura de DMSO, PEG 400 e glicerol 2,25%. Para isso, foram pesados 0,0325 g de 7-NI e acrescentado 150  $\mu\text{L}$  de DMSO, que foram homogeneizados manualmente até solubilização completa. Em seguida foram adicionados, 10,0 mL de PEG 400 sob agitação magnética. Após a homogeneização completa do 7-NI, adicionou-se 25,0 mL de uma solução aquosa de glicerol 4,5% (volume final 2,25%). Por fim, a solução teve seu volume completado para 50,0 mL com água ultrapura. A solução de 7-NI livre foi filtrada através de papel-filtro quantitativo com tamanho de poro de 8,0  $\mu\text{m}$  e armazenada a temperatura ambiente ao abrigo da luz.

##### **3.2.2 Preparação das nanoemulsões pela técnica de emulsificação espontânea**

As nanoemulsões não peguiladas contendo 7-NI (NENPEG-7NI) foram preparadas pelo método de emulsificação espontânea usando condições previamente otimizadas, conforme descrito por Barp et al. (2018). Inicialmente, 700 mg de óleo de rícino foram pesados diretamente em um cálice. Em seguida foram adicionados 1,0 mL de uma solução de lecitina de soja (Lipoid S100)  $7 \text{ mg.mL}^{-1}$  e 7,0 mL de uma solução de 7-NI  $2,0 \text{ mg.mL}^{-1}$ , ambas em etanol. O volume final foi completado para 20,0 mL com etanol e as soluções resultantes foram mantidas em banho ultrassônico por 5 minutos para completa solubilização dos componentes.

Para a preparação da fase aquosa, 20,0 mL de uma solução de Tween® 80 0,5% (m/v) e 20,0 mL de uma solução de glicerol 2,25% (m/v) foram adicionados a um béquer e mantidos sob agitação magnética. Em seguida, a fase orgânica foi adicionada no interior da fase aquosa sob agitação magnética, com o auxílio de uma seringa. A nanoemulsão foi formada instantaneamente após a difusão do solvente orgânico na fase aquosa, e foi mantida sob agitação magnética por 5 minutos, para fornecer equilíbrio ao sistema. As formulações foram então submetidas à evaporação sob pressão reduzida à temperatura de 40 °C em evaporador rotatório, para eliminação do solvente orgânico e concentração até volume final de 20,0 mL. Após a evaporação, o pH das formulações foi ajustado a 7,4 com NaOH 0,1 M, as nanoemulsões foram filtradas através de papel-filtro quantitativo com tamanho de poro de 8,0 µm e armazenadas a temperatura ambiente ao abrigo da luz.

A preparação da fase orgânica das formulações das nanoemulsões peguiladas (NEPEG-7NI) contendo 7-NI seguiu o mesmo protocolo experimental, diferindo pela adição de 10,0 mL de uma solução etanólica de DSPE-PEG2000 4,0 mg.mL<sup>-1</sup> à fase orgânica da formulação e pela adição de 5,0 mL da solução de 7-NI 2,0 mg.mL<sup>-1</sup>. Para a preparação da fase aquosa, 20,0 mL de uma solução de Tween® 80 0,2% (m/v) e 20,0 mL de uma solução de glicerol 4,5% (m/v) foram adicionados a um béquer e mantidos sob agitação magnética. A fase orgânica foi então adicionada no interior da fase aquosa sob agitação magnética, sendo mantida sob agitação por mais 5 minutos, para fornecer equilíbrio ao sistema. Em seguida, as formulações foram então submetidas à evaporação sob pressão reduzida à temperatura de 40 °C em evaporador rotatório, para eliminação do solvente orgânico e concentração até volume final de 20,0 mL. Após a evaporação, o pH das formulações foi ajustado a 7,4 com NaOH 0,1 M, e as nanoemulsões foram filtradas através de papel-filtro quantitativo com tamanho de poro de 8,0 µm e armazenadas a temperatura ambiente ao abrigo da luz.

Nanoemulsões peguiladas e não peguiladas brancas (NEPEG-B e NENPEG-B) foram preparadas empregando a mesma metodologia, mas sem a adição da solução de 7-nitroindazol à fase orgânica. Todas as formulações foram preparadas em triplicata.

### **3.2.3 Determinação do diâmetro médio da gotícula, índice de polidispersão e potencial zeta**

O diâmetro médio de gotícula e o índice de polidispersão foram determinados pela técnica de espalhamento dinâmico da luz em Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Reino Unido). As medidas foram realizadas a 25 °C após diluição apropriada das amostras (1:100 v/v)

em água ultrapura (Milli-Q®, Millipore, EUA). A análise do tamanho e distribuição granulométrica foi realizada em ângulo fixo de detecção de 173°. O potencial zeta das nanoemulsões foi determinado por anemometria laser-Doppler em equipamento Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Reino Unido). As amostras foram diluídas 1:100 (v/v) em água ultrapura (Milli-Q®, Millipore, EUA) e acondicionadas em células eletroforéticas, onde o potencial de  $\pm 150$  mV foi estabelecido. Os valores de potencial zeta foram calculados a partir da média dos valores de mobilidade eletroforética obtidos, usando a equação de Smoluchowski.

### 3.2.4 Avaliação do teor e eficiência de encapsulação

O teor de 7-NI nas nanoemulsões foi determinado conforme metodologia de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em modo de fase reversa previamente desenvolvida e validada por BARP (2016). As análises foram realizadas em cromatógrafo Shimadzu constituído de bomba LC-10AD e detector UVVIS modelo SDP-10AVP (Kyoto, Japão), empregando coluna de fase reversa Luna C18 5  $\mu\text{m}$  (150 x 4,60 mm – Phenomenex, USA) mantida a 30 °C e acoplada à pré-coluna (4,0 mm x 3,0 mm – Phenomenex, USA), e fase móvel constituída de tampão acetato de amônia 25 mM (pH 8,0) e acetonitrila (50:50 v/v), previamente filtrados em membrana 0,45  $\mu\text{m}$  de acetato de celulose e poliamida. O sistema foi operado isocraticamente com fluxo de 1 mL.min<sup>-1</sup> e a detecção foi realizada no UV no comprimento de onda de 360 nm.

Para as análises de teor, uma alíquota de 50  $\mu\text{L}$  de cada uma das formulações contendo 7-NI foi transferida para balões volumétricos de 5,0 mL e o volume final completado com acetonitrila. As amostras foram mantidas em banho ultrassônico durante 20 min. Em seguida as amostras foram filtradas em membrana de PVDF (0,22  $\mu\text{m}$ , Milipore) e injetadas no cromatógrafo. As análises foram realizadas em triplicata e as áreas médias dos picos referentes ao 7-NI foram comparadas à área da solução padrão de concentração conhecida (10  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) analisada nas mesmas condições. O teor de 7-NI nas nanoemulsões foi expresso como  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . Para a avaliação da eficiência de encapsulação, as nanoemulsões foram submetidas à ultrafiltração/centrifugação usando unidades Microcon® com membrana Ultracel YM-100 (100.000 NMWL, Millipore, EUA). Volumes de 400  $\mu\text{L}$  de cada uma das formulações foram adicionados nas unidades de filtração e centrifugadas a 3000 x g por 10 minutos. O ultrafiltrado foi analisado por CLAE, nas condições previamente descritas. A eficiência de encapsulação (%)

foi estimada como sendo a diferença entre a concentração total de fármaco e a sua concentração no sobrenadante.

### **3.2.5 Avaliação do perfil de biodistribuição encefálica do 7-nitroindazol após administração intravenosa do fármaco livre e associado às nanoemulsões**

#### 3.2.5.1 Animais

O estudo de biodistribuição encefálica do 7-NI livre e incorporado às nanoemulsões peguilladas e não peguilladas foi avaliado em ratos Wistar adultos (machos e fêmeas com 3-4 meses de idade) pesando entre 250 e 350 g. Os animais foram fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina e mantidos em grupos de 5 animais por caixa (49 cm x 34 cm x 16 cm) em local com temperatura ambiente controlada ( $22 \pm 2$  °C), ciclo de 12 horas de luz claro/escuro (luzes ligadas a partir das 7h), com livre acesso à ração e água. Todos os procedimentos foram conduzidos de acordo com as recomendações do *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* do *National Institute of Health* (NIH) e aprovados pelo Comitê de Ética para Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Catarina (CEUA/UFSC, protocolo 1347220419). Antes de iniciar os procedimentos experimentais, os animais foram manipulados (*handling*) por pelo menos 4 a 5 dias pelo experimentador com o objetivo de habituar o animal ao experimentador e diminuir o estresse causado aos animais durante a experimentação.

#### 3.2.5.2 Avaliação do perfil de biodistribuição encefálica in vivo do 7-nitroindazol após administração intravenosa do fármaco livre e associado às nanoemulsões

A administração intravenosa do fármaco livre e nanoemulsionado, na dose de 10 mg.kg<sup>-1</sup>, foi realizada pela veia da cauda lateral em uma administração única de curta duração, com taxa de infusão máxima de 1 mL.min<sup>-1</sup> (não excedendo 10 min de administração), usando agulhas do tipo *butterfly* acopladas a uma bomba de infusão. Para isso, os animais foram anestesiados com isofurano (5,0% para indução e 2,5% para manutenção). Para avaliação do perfil de biodistribuição encefálica, após 5, 15 e 30 min do término da administração do fármaco os animais foram anestesiados com isoflurano (5,0%), e após confirmação da anestesia, através da conferência de reflexo pelo pressionamento da pata, os animais foram submetidos à decapitação por guilhotina. O encéfalo foi removido e as estruturas encefálicas, incluindo o

bulbo olfatório, córtex pré-frontal, hipocampo, estriado, tronco encefálico e cerebelo, foram rapidamente dissecadas e mantidas em freezer -80 °C para posterior extração do 7-NI por metodologia previamente estabelecida e análise por CLAE. Os ensaios foram realizados no departamento de Farmacologia do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina, em parceria com o Laboratório do Óxido Nítrico.

### 3.2.5.3 Metodologia analítica de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para quantificação do 7-nitroindazol em tecido animal

Para a quantificação do 7-NI no tecido animal, uma metodologia analítica de CLAE em modo de fase reversa foi adaptada a partir dos estudos de BARP (2016), usando um cromatógrafo Shimadzu constituído de bomba LC-10AD e detector UVVIS modelo SDP-10AVP (Kyoto, Japão). As análises cromatográficas foram realizadas usando uma coluna de fase reversa Luna C18 5 µm (150 x 4,60 mm – Phenomenex, EUA), mantida a 30 °C e acoplada a uma pré-coluna C18 (4,0 mm x 3,0 mm – Phenomenex, USA). O sistema foi operado isocriticamente com fluxo de 1 mL.min<sup>-1</sup> a 30 °C, com fase móvel constituída de tampão acetato de amônia 25 mM (pH 8,0) e acetonitrila (85:15; v/v). A detecção foi realizada no UV no comprimento de onda de 360 nm. Nas condições testadas, o tempo de retenção do 7NI foi de aproximadamente 23 min. O método analítico foi previamente validado quanto aos parâmetros de linearidade, limite de detecção e quantificação, precisão e exatidão (BRASIL, 2017). Para as análises, uma solução de 7NI de 10 µg.mL<sup>-1</sup> (solução de trabalho) foi preparada a partir de solução estoque de 7-NI na concentração de 100 µg.mL<sup>-1</sup> em acetonitrila. Todas as soluções padrões foram preparadas no dia da análise. A linearidade foi determinada por meio da construção de três curvas analíticas independentes, em sete concentrações na faixa de 0,5 a 25,0 µg.mL<sup>-1</sup> de 7-NI em acetonitrila. Para os ensaios utilizando matriz biológica, a linearidade do método foi novamente avaliada por meio da construção de três curvas analíticas independentes, em sete concentrações na faixa de 0,1 a 10,0 µg.mL<sup>-1</sup> de 7-NI e 10 µg.mL<sup>-1</sup> de para-nitroanilina (PNA) usada como padrão interno, utilizando-se como matriz plasma de ratos. O método mostrou-se linear na faixa de concentração de 0,5 a 25,0 µg.mL<sup>-1</sup> (equação da reta,  $y = 29335x + 2927,4$ ;  $r = 0,999$ ), e 0,1 a 10,0 µg.mL<sup>-1</sup> (equação da reta  $y = 0,0914x - 0,0017$ ), apresentando limites de detecção e quantificação de 0,03 µg.mL<sup>-1</sup> e de 0,10 µg.mL<sup>-1</sup>, respectivamente. O método também mostrou ser preciso e exato (D.P.R < 5,0%).

#### 3.2.5.4 Preparação das amostras de estruturas encefálicas para análise de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

Inicialmente, as amostras foram pesadas uma a uma em balança analítica e adicionadas a microtubos de 2,0 mL contendo 500,0  $\mu\text{L}$  de acetonitrila. Em seguida, as amostras foram submetidas a sonda de ultrassom por 30 segundos a 1 minuto para destruição e homogeneização do tecido de acordo com tamanho observado da estrutura. Imediatamente após a ultrassonificação, as amostras foram centrifugadas a 3000 x g por 5 minutos. O sobrenadante foi coletado com auxílio de uma seringa de 1,0 mL, e filtrado através de uma membrana de filtração de PVDF 0,22  $\mu\text{m}$  (Milipore, EUA). A área sob a curva do 7-NI foi normalizada pela área do padrão interno (PNA 10  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), injetado previamente a injeção das amostras biológicas. A quantidade de 7-NI foi dada em  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  de tecido e foi calculada utilizando-se a equação da reta obtida a partir da linearidade.

#### 3.2.5.5 Análise estatística

Os resultados referentes a caracterização das nanoemulsões serão expressos como a média  $\pm$  desvio padrão. A análise estatística dos resultados do ensaio experimental de biodistribuição encefálica será realizado através da análise de variância (ANOVA) de duas vias, seguido do teste Post-hoc de Newman-Keuls. Os valores de  $p < 0,05$  serão considerados significativos, sendo os testes estatísticos realizados com o programa GraphPad Prism 9.0® (San Diego, CA, EUA).

## 4. RESULTADOS

### 4.1 PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DAS NANOEMULSÕES

Após a preparação das nanoemulsões peguiladas (NEPEG-7NI) e não-peguiladas (NENPEG-7NI) contendo 7-NI, foram caracterizadas quanto ao pH, tamanho médio de gotícula, índice de polidispersão (PDI), potencial zeta, teor e eficiência de encapsulação, para avaliar a qualidade das formulações. Os resultados estão apresentados na Tabela 2.

**Tabela 2.** Caracterização química e físico-química das nanoemulsões peguiladas e não-peguiladas contendo 7-NI (n=3).

	<b>pH</b>	<b>Tamanho médio (nm) (PDI)<sup>1</sup></b>	<b>Potencial Zeta (mV)</b>	<b>Teor de 7-NI (µg/mL)</b>	<b>EE(%)<sup>2</sup></b>
<b>NEPEG-7NI</b>	7,40 ± 0,05	208,0 ± 5,75 (0,255)	-42,7 ± 2,88	431,31 ± 14,89	68,13
<b>NENPEG-7NI</b>	7,40 ± 0,13	264,1 ± 3,83 (0,269)	-25,6 ± 1,15	666,81 ± 40,70	72,50

<sup>1</sup>Entre parênteses: PDI - índice de polidispersão, <sup>2</sup>EE: Eficiência de encapsulação.

As nanoemulsões tiveram seu pH ajustado para 7,4 conforme pode ser observado na Tabela 2. A técnica de emulsificação espontânea utilizada no presente trabalho levou a formação de dispersões coloidais monodispersas, com tamanho médio de gotícula de cerca de 208 e 264 nm e carga superficial negativa com potencial zeta de cerca de -42 e -25 mV para as formulações peguiladas e não-peguiladas, respectivamente. O teor de 7-NI foi de cerca de 431,3 e 666,8 µg.mL<sup>-1</sup> e a eficiência de encapsulação do composto atingiu valores máximos de 68% e 72% para as formulações peguiladas e não-peguiladas, respectivamente, indicando que o 7-NI está preferencialmente associado às gotículas das nanoemulsões.

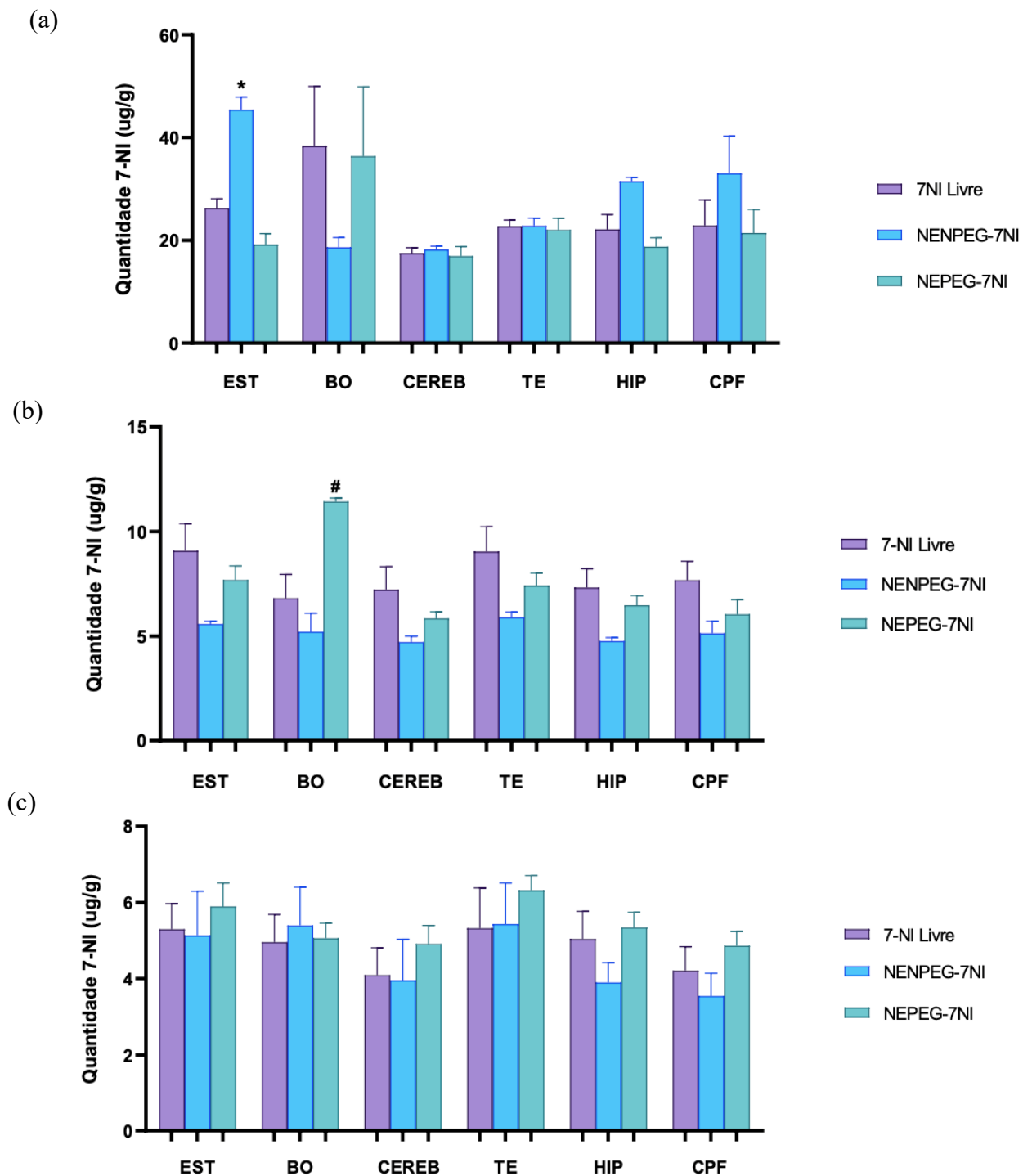
### 4.2 AVALIAÇÃO DO PERFIL DE BIODISTRIBUIÇÃO ENCEFÁLICA DO 7-NITROINDAZOL LIVRE E NANOEMULSIONADO

O estudo de biodistribuição encefálica foi realizado para avaliar e comparar a quantidade de 7-NI que alcança as estruturas encefálicas após administração do fármaco livre e na forma nanoemulsionada. Nesse ensaio, obteve-se os dados referentes à quantidade de 7-NI nos seguintes tecidos após 5, 15 e 30 minutos da administração na dose de 10 mg.kg<sup>-1</sup>: bulbo olfatório (BO); córtex pré-frontal (CPF); hipocampo (HIPO); estriado (EST); tronco encefálico (TE); cerebelo (CEREB). Os resultados estão mostrados na tabela 3 e figura 8.





**Figura 8.** Avaliação da biodistribuição encefálica do 7-NI entre os tecidos do sistema nervoso central após a administração intravenosa do 7-NI livre, e das nanoemulsões não pegulada e pegulada contendo 7-NI em ratos na dose de  $10 \text{ mg.kg}^{-1}$ . (a) Comparação entre os tecidos após 5 minutos da administração intravenosa. (b) Comparação entre os tecidos após 15 minutos da administração intravenosa. (c) Comparação entre os tecidos após 30 minutos da administração intravenosa. BO: Bulbo olfatório; CEREB: cerebelo; CPF: córtex pré-frontal; EST: estriado; HIP: hipocampo; TRONCO: tronco encefálico. ANOVA de duas vias seguida do teste *Post-hoc* de Newman-Keuls. \* $p < 0,05$  quando comparado com a formulação NEPEG-7NI; # $p < 0,05$  quando comparado com o 7-NI livre e a NENPEG-7-NI.



A análise estatística foi realizada com intuito de comparar o efeito da forma de administração (7-NI, NENPEG, NEPEG) sobre a quantidade de 7-NI nas diferentes estruturas encefálicas, dentro de cada tempo após a administração. A ANOVA de duas vias (forma de administração vs estruturas encefálicas) indicou um efeito significativo no tempo 15 minutos [ $F(2,70) = 21,391, p < 0,05$ ], quando as formas de administração foram comparadas. A quantidade de 7-NI nas diferentes estruturas foi estatisticamente diferente após 5 minutos [ $F(5,72) = 3,0113, p < 0,05$ ] e 15 minutos [ $F(5,70) = 3,3842, p < 0,05$ ] da administração. Finalmente, a interação entre os fatores foi observada nos tempos de 5 minutos [ $F(10,72) = 2,6938, p < 0,05$ ] e 15 minutos [ $F(10,70) = 2,6938, p < 0,05$ ]. Após o teste Post-hoc de Newman-Keuls foi possível verificar que no tempo de 5 minutos houve diferença significativa entre o grupo NENPEG-7NI em comparação com o grupo NEPEG-7NI no tecido estriado do encéfalo, mostrando que o 7-NI melhor se distribuiu na região com a administração desta formulação. Igualmente, no tempo de 15 minutos após a administração intravenosa, a administração da NEPEG-7NI permitiu um maior alcance do 7-NI no bulbo olfatório, quando em comparação com o grupo NENPEG-7NI e o 7-NI livre e em comparação com os demais tecidos analisados. Em relação ao tempo de 30 min após administração, nenhuma diferença significativa foi observada. No entanto, de modo geral, tanto a administração do 7-NI livre como nanoemulsionado na dose de  $10 \text{ mg.kg}^{-1}$  pela via intravenosa levou à obtenção de concentrações mensuráveis do fármaco nos diferentes tecidos encefálicos, mostrando que é capaz de atravessar a BHE.

## 5 DISCUSSÃO

Nanoemulsões peguiladas e não peguiladas foram desenvolvidas no nosso laboratório com um intuito de veicular o 7-NI pela via intravenosa. Estudos mostraram que na dose de  $10 \text{ mg/kg}$  por esta via, as nanoemulsões permitiram a melhora de parâmetros farmacocinéticos do 7-NI e, em especial, as nanoemulsões peguiladas conduziram a um aumento significativo nos valores de  $C_{\text{max}}$ ,  $t_{\text{max}}$  e ASC (resultados não publicados), provavelmente decorrente da redução da captura das partículas pelas células do sistema imune (DEVALAPALLY et al., 2015). Considerando que o 7-NI tem mostrado resultados promissores para tratamento de condições neurodegenerativas associadas ao desbalanço na produção de NO, este trabalho teve como objetivo avaliar e comparar a distribuição encefálica deste composto na forma livre e nanoemulsionada após administração intravenosa. Sabe-se que presença da BHE diminui a permeabilidade plasmática para o SNC, impedindo a chegada de xenobióticos. A BHE é uma

estrutura de permeabilidade altamente seletiva que protege o SNC de substâncias potencialmente neurotóxicas presentes no sangue e sendo essencial para função metabólica normal do cérebro, atuando como regulador da homeostase (ALAM et al., 2010). A passagem de fármacos através da BHE é altamente dependente das características da molécula, como lipofilicidade, tamanho ( $< 500$  Da), capacidade de inibir a glicoproteína-P e capacidade de ultrapassar passivamente a barreira (APOLINÁRIO et al., 2020). Considerando as características da molécula do 7-NI – alta lipofilicidade e peso molecular de cerca de 163 Da – o mecanismo mais provável de passagem pela BHE é a difusão passiva.

Seguindo o planejamento experimental do projeto de pesquisa, foram realizados os ensaios de biodistribuição nas diferentes estruturas encefálicas: bulbo olfatório, estriado, tronco encefálico, hipocampo, córtex pré-frontal e cerebelo. De modo geral, os resultados obtidos mostraram que o 7-NI atravessa a BHE, e distribui-se amplamente pelo SNC, incluindo o estriado e o hipocampo – estruturas tipicamente envolvidas na fisiopatologia de doenças neurodegenerativas, como a doença de Parkinson e Alzheimer –, o que explica os seus efeitos benéficos em distúrbios neurodegenerativos. Mesmo considerando as diferenças estatísticas encontradas (NENPEG-7NI & NEPEG-7NI, tempo de 5 min, estriado; NEPEG-7NI & NENPEG-7NI e 7-NI livre, tempo 15 min, bulbo olfatório;  $p < 0,05$ ), não foi possível dizer que as nanoemulsões tenham aumentado o alcance do 7-NI no SNC, em relação ao fármaco livre, atuando, portanto, como o veículo, a partir do qual o fármaco é liberado para a circulação sistêmica. Por outro lado, estudos de biodistribuição do 7-NI em outros tecidos estão sendo realizados, e estes resultados poderão melhor evidenciar o efeito do revestimento das nanoemulsões com polietilenoglicol sobre o escape da captura pelas células do sistema imune.

A administração intravenosa permite maior chegada do fármaco aos capilares do cérebro. Devido a conexão dos neurônios com os vasos sanguíneos, o composto consegue ter maior acesso ao encéfalo, apresentando grande potencial de entrega do fármaco. Contudo, há baixa acumulação do fármaco nos tecidos devido ao rápido *clearance* da BHE. Fatores como o baixo tempo de meia-vida do composto e a ligação às proteínas plasmáticas, podem estar associados ao impedimento da passagem pela BHE. Outros estudos demonstram que a incorporação de fármacos a sistemas lipídicos administrados pela via intravenosa é efetiva para entrega do composto ao cérebro (ALAM et al., 2010). Além da característica lipídica das nanoemulsões, o tamanho nanométrico permite a passagem facilitada, permanecendo intacta após a passagem pela BHE e conseguindo entregar o fármaco ao local de ação desejado (ALAM, 2013). A incorporação do fosfolípido peguado anfifílico, o DSPE-PEG5000, na formulação peguila forma uma barreira de proteção das gotículas da nanoemulsão evitando o reconhecimento pelo

sistema fagocítico mononuclear dos macrófagos (OWENSIII; PEPPAS, 2006). O surfactante polissorbato 80 (Tween 80 ®) é amplamente utilizado para entrega de fármacos ao encéfalo pela diminuição do reconhecimento e opsonização dos macrófagos e pelo aumento da retenção das nanoemulsões no endotélio cerebral (CAPRIFICO et al., 2020). Outro mecanismo de ação, seria o aumento da passagem através da BHE devido a inibição de transportadores, como a glicoproteína-P que realiza o efluxo de moléculas, comum entre os tensoativos não-iônicos (CAPRIFICO et al., 2020; APOLINÁRIO et al., 2020).

## **6 CONCLUSÃO**

O estudo realizado demonstrou, de maneira inédita, que o 7-NI é capaz de atravessar a BHE alcançando as diferentes estruturas encefálicas em quantidades mensuráveis pelo método analítico empregado. A molécula distribuiu-se amplamente pelo SNC, especialmente em estruturas relacionadas a distúrbios neurodegenerativos e motores, podendo exercer um papel relevante no tratamento dessas doenças. No entanto, apesar das diferenças estatísticas encontradas, não foi possível mostrar o aumento da concentração do 7-NI no SNC após a administração das nanoemulsões, quando comparado ao fármaco livre. Por outro lado, as formulações nanoemulsionadas se mostraram promissoras como veículo para este composto lipossolúvel, permitindo sua administração intravenosa. Como continuidade do estudo, estão sendo realizados estudos de biodistribuição do 7-NI livre e nanoemulsionado nos demais tecidos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 7-NITROINDAZOLE. **DrugBank**. Disponível em: <https://www.drugbank.ca/drugs/DB02207>. Acesso em: 30 jul. 2022.
- ACKERMAN, S. **Discovering the brain**. Washington, D.C: National Academy Press, 1992. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK234151/>. Acessado em: 5 ago. 2022.
- ALAM, M. I. et al. Strategy for effective brain drug delivery. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 40, n. 5, p. 385–403, ago. 2010.
- APOLINÁRIO, A. et al. ABRINDO A CAIXA DE PANDORA DOS NANOMEDICAMENTOS: HÁ REALMENTE MUITO MAIS ‘ESPAÇO LÁ EMBAIXO’. **Química Nova**, 2020.
- AZMI, N. A. N. et al. Nanoemulsions: Factory for food, pharmaceutical and cosmetics. **Processes**, [S.l.], v. 7, n. 9, p. 1–34, set. 2019.
- BANACH, M. et al. Nitric Oxide, Epileptic Seizures, and Action of Antiepileptic Drugs. **CNS & Neurological Disorders - Drug Targets**, v. 10, n. 7, p. 808–819, 1 nov. 2011.
- BARP, C. G. Desenvolvimento e caracterização de nanoemulsão de 7-nitroindazol para inibição da produção do óxido nítrico. 2016. 100 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2016.
- BEAR, M. F.; CONNORS, B. W.; PARADISO, M. A. **Neuroscience: exploring the brain**. 4. ed ed. Philadelphia: Wolters Kluwer, 2016.
- BORTOLANZA, M. et al. Antidyskinetic Effect of 7-Nitroindazole and Sodium Nitroprusside Associated with Amantadine in a Rat Model of Parkinson’s Disease. **Neurotoxicity Research**, v. 30, n. 1, p. 88–100, jul. 2016.
- BRASIL. Agência de Vigilância Sanitária. RDC nº166. Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências., Brasília, 25 ago. 2017.
- BUSH, M. A.; POLLACK, G. M. Pharmacokinetics and protein binding of the selective neuronal nitric oxide synthase inhibitor 7-nitroindazole. **Biopharmaceutics & Drug Disposition**, v. 21, n. 6, p. 221–228, set. 2000.
- CAPRIFICO, A. E. et al. Overcoming the Blood-Brain Barrier: Functionalised Chitosan Nanocarriers. **Pharmaceutics**, v. 12, n. 11, p. 1013, 23 out. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390%2Fpharmaceutics12111013>. Acesso em: 29 jul. 2022.
- COSENZA, M. et al. Nitric Oxide in the Nervous System. Em: **Vitamins & Hormones**. [s.l.] Elsevier, 2014. v. 96p. 79–125.
- DEVALAPALLY, H. et al. Optimization of PEGylated nanoemulsions for improved pharmacokinetics of BCS class II compounds. **Drug Delivery**, v. 22, n. 4, p. 467–474, 19

maio 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.3109/10717544.2013.869275>. Acesso em: 5 ago. 2022.

EBADI, M.; SHARMA, S. K. Peroxynitrite and Mitochondrial Dysfunction in the Pathogenesis of Parkinson's Disease. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 5, n. 3, p. 319–335, jun. 2003.

FÖRSTERMANN, U. & SESSA, W. Nitric oxide synthases: regulation and function. **European Heart Journal**, v. 33, p. 829–837, 2012.

GOTTI, S. et al. Distribution of nitric oxide synthase immunoreactivity in the mouse brain. **Microscopy Research and Technique**, v. 68, n. 1, p. 13–35, set. 2005.

GOVERS, R.; OESS, S. To NO or not to NO: 'where?' is the question. **Histology and Histopathology**, v. 19, p. 585-605, 2004.

GUPTA, A. et al. Nanoemulsions: Formation, properties and applications. **Soft Matter**, [S.l.], v. 12, n. 11, p. 2826–2841, mar. 2016.

HALL, J. E.; GUYTON, A. C. **Guyton and Hall textbook of medical physiology**. 12th ed ed. Philadelphia, Pa: Saunders/Elsevier, 2011.

JOVITO, Bárbara Lopes. NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS SÓLIDAS E SEU USO NO TRATAMENTO DE GLIOBLASTOMAS: REVISÃO. 2017. 47 f. TCC (Graduação) - Curso de Farmácia, Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília, 2017. Disponível em: [https://bdm.unb.br/bitstream/10483/17641/1/2017\\_BarbaraLopesJovito.pdf](https://bdm.unb.br/bitstream/10483/17641/1/2017_BarbaraLopesJovito.pdf). Acesso em: 28 jul. 2022.

KLATT, P. et al. The pteridine binding site of brain nitric oxide synthase. Tetrahydrobiopterin binding kinetics, specificity, and allosteric interaction with the substrate domain. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 269, n. 19, p. 13861–13866, 13 maio 1994.

KLEINERT, H., PAUTZ, A., LINKER, K., SCHWARZ, P.M. Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase. **European Journal of Pharmacology**, v. 500, p. 255–266, 2004.

LOVELYN, C; ATTAMA, A. A. Current State of Nanoemulsions in Drug Delivery. **Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology**, [S.l.], v. 2, n. 5, p. 626-639, dez. 2011.

MEMARPOUR, S. et al. Neuronal Nitric Oxide Inhibitor 7-Nitroindazole Improved Brain-Derived Neurotrophic Factor and Attenuated Brain Tissues Oxidative Damage and Learning and Memory Impairments of Hypothyroid Juvenile Rats. **Neurochemical Research**, v. 45, n. 11, p. 2775–2785, nov. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11064-020-03128-6>. Acesso em: 5 ago. 2022.

MIAN, A. I.; ARANKE, M.; BRYAN, N. S. Nitric Oxide and its Metabolites in the Critical Phase of Illness: Rapid Biomarkers in the Making. **Open Biochemistry Journal**, [S.l.], v. 7, p. 24–32, mar. 2013.

NUNES, C.; LARANJINHA, J. Nitric oxide and dopamine metabolism converge via mitochondrial dysfunction in the mechanisms of neurodegeneration in Parkinson's disease. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 704, p. 108877, jun. 2021.

OWENSIII, D.; PEPPAS, N. Opsonization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 307, n. 1, p. 93–102, 3 jan. 2006. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S037851730500668X>. Acesso em: 28 jul. 2022.

PANTHI, S.; MANANDHAR, S.; GAUTAM, K. Hydrogen sulfide, nitric oxide, and neurodegenerative disorders. **Translational Neurodegeneration**, v. 7, n. 1, p. 3, dez. 2018.

PENGON, S. et al. The effect of surfactant on the physical properties of coconut oil nanoemulsions. **Asian Journal of Pharmaceutical Sciences**, [S.l.], v. 13, n. 5, p. 409–414, set. 2018.

PICÓN-PAGÈS, P.; GARCIA-BUENDIA, J.; MUÑOZ, F. J. Functions and dysfunctions of nitric oxide in brain. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease**, v. 1865, n. 8, p. 1949–1967, ago. 2019.

RAI et al. Nanoemulsion as pharmaceutical carrier for dermal and transdermal drug delivery: Formulation development, stability issues, basic considerations and applications. **Journal of Controlled Release**, [S.l.], v. 270, p. 203–218, jan. 2018.

SHAKER, D. S. et al. Nanoemulsion: A review on mechanisms for the transdermal delivery of hydrophobic and hydrophilic drugs. **Scientia Pharmaceutica**, [S.l.], v. 87, n. 3, p. 1–34, jul. 2019.

SINGH, Y. et al. Nanoemulsion: Concepts, development and applications in drug delivery. **Journal of Controlled Release**, [S.l.], v. 252, p. 28–49, abr. 2017.

STAHL, S. M. **Stahl's essential psychopharmacology: neuroscientific basis and practical application**. 4th ed ed. Cambridge ; New York: Cambridge University Press, 2013.

SZABÓ, C. Physiological and pathophysiological roles of nitric oxide in the central nervous system. **Brain Research Bulletin**, v. 41, n. 3, p. 131–141, jan. 1996.

THAU, L.; REDDY, V.; SINGH, P. Anatomy, Central Nervous System. Em: **StatPearls**. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2022. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK542179/>. Acesso em: 3 ago. 2022.

YOUNG, C. B.; REDDY, V.; SONNE, J. Neuroanatomy, Basal Ganglia. Em: **StatPearls**. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2022. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK537141/>. Acessado em: 4 ago. 2022.