

**Clarissa de Medeiros Amorim**

**DESENVOLVIMENTO DE SISTEMAS DE LIBERAÇÃO  
NANOEMULSIONADOS MUCOADESIVOS CONTENDO  
ÁCIDO ELÁGICO PARA ADMINISTRAÇÃO NASAL VISANDO  
O TRATAMENTO DA DOENÇA DE ALZHEIMER**

Tese submetida ao Programa de Nanotecnologia Farmacêutica da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de doutor em Nanotecnologia Farmacêutica.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Elenara Lemos Senna

**FLORIANÓPOLIS  
2014**

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

Amorim, Clarissa de Medeiros

DESENVOLVIMENTO DE SISTEMAS DE LIBERAÇÃO  
NANOEMULSIONADOS MUCOADESIVOS CONTENDO ÁCIDO ELÁGICO PARA  
ADMINISTRAÇÃO NASAL VISANDO O TRATAMENTO DA DOENÇA DE  
ALZHEIMER / Clarissa de Medeiros Amorim ; orientadora,  
Elenara Lemos-Senna - Florianópolis, SC, 2014.  
228 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa  
Catarina, Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-  
Graduação em Nanotecnologia Farmacêutica.

Inclui referências

1. Nanotecnologia Farmacêutica. 2. Nanoemulsões  
Catiônicas. 3. Doença de Alzhmeir. 4. Cristais líquidos . 5.  
Ácido elágico. I. Lemos-Senna, Elenara. II. Universidade  
Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em  
Nanotecnologia Farmacêutica. III. Título.

Clarissa de Medeiros Amorim

**DESENVOLVIMENTO DE SISTEMAS DE LIBERAÇÃO  
NANOEMULSIONADOS MUCOADESIVOS CONTENDO  
ÁCIDO ELÁGICO PARA ADMINISTRAÇÃO NASAL VISANDO  
O TRATAMENTO DA DOENÇA DE ALZHEIMER**

Esta Tese foi julgada adequada para obtenção do Título de “doutor”, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Nanotecnologia Farmacêutica

Florianopolis, 4 de agosto de 2014.

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Adriana Pohlmann  
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Nanotecnologia  
Farmacêutica

**Banca Examinadora:**

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Palmira Daflon Gremião (PPGNANO)

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Leticia Koester (UFRGS)

---

Prof. Dr. Rui Daniel Predger (Instituto D'OR)

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Tania Bresolin (UNIVALI)

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Gecioni Loch Neckel (UFSC)

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Elenara Lemos Senna (UFSC- Orientadora)

Dedico este trabalho  
aos meus pais, Alvaci e  
Rauli, e ao meu marido  
Naikow.

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Alvaci e Rauli. Tudo o que sou e conquistei devo a vocês. Obrigada por estarem sempre tão presentes me aconselhando, incentivando e me enchendo de carinho. Não há como expressar minha felicidade e orgulho em dedicar este trabalho a vocês, como forma de agradecimento por todo o amor e esforço, pois sei que se doaram inteiros e renunciaram aos seus sonhos para que eu pudesse viver os meus.

Ao meu marido, Naikow pelo companheirismo, amor, carinho, dedicação e incentivo oferecido antes, durante e, seguramente, por toda a minha vida.

Ao meu irmão Gabriel, pela companhia e por me incentivar e ajudar nos momentos difíceis.

À minha orientadora Profa. Dra. Elenara Lemos Senna por todo seu empenho, confiança, sabedoria, dedicação em todos os momentos e por ter tornado possível este trabalho.

Ao professor, Dr. Rui Prediger por toda dedicação, colaboração, empenho e por disponibilizar seus laboratórios e alunos para o experimento farmacológico comportamental.

Aos Professores, Dr. Marcelo Farina e Dra. Carla Tasca pela colaboração e dedicação nos ensaios com marcadores bioquímicos de oxidação e de viabilidade celular.

À professora Dr<sup>a</sup>. Maria Palmira Daflon Gremião pela dedicação, sabedoria transmitida, paciência e por me acolher tão bem em Araraquara durante o estágio sanduíche nacional.

Aos colegas e professores do laboratório de farmacotécnica: Fran, Talitha, Cristian, Bianca, Luís, Luiza, Geórgia, Geci, André, Mari e Mari Batisti, Angela, Rosane, Diva, Sandra e Nilson pelo companheirismo, risadas nos momentos de descontração. E principalmente à Jana, Leti e Thaisa pela amizade, cumplicidade e pela palavra amiga nos momentos difíceis. Vocês conseguiram tornar os dias de trabalho mais alegres e divertidos.

Aos amigos de Araraquara: Leo, Ana (Velma), Char, Tati, Lilian, Jéssica, Bruno, Andréia, Fernanda, Marcia, Gisela e Jovan pelo carinho, motivação, otimismo e por tornar minha estada mais alegre. E em especial à Flávia por sua dedicação, paciência, sabedoria transmitida, empenho e incentivo enfim, não tenho palavras para te agradecer.

Aos amigos do CCB: Dirleise, Wagner, Paulo e Jozimar pela paciência, comprometimento, empenho, sabedoria e por tornarem possível a experimentação farmacológica.

Ao amigo Ismael pelo incentivo, otimismo e pela amizade que nasceu durante os experimentos.

## RESUMO

A doença de Alzheimer é uma doença neurodegenerativa caracterizada pelo declínio progressivo no número de neurônios colinérgicos, sendo a causa mais comum de prejuízos cognitivos em indivíduos com mais de 65 anos de idade. Para o tratamento profilático e terapêutico desta doença, alguns estudos têm evidenciado o uso de compostos polifenólicos, como o ácido elágico (AE). O AE é um derivado dimérico do ácido gálico que possui diversas propriedades farmacológicas, tais como antioxidante, antitumoral, antimutagênica, hipoglicemiante e antibacteriana. Entretanto, este polifenol apresenta baixa solubilidade aquosa e elevado metabolismo no trato gastrointestinal, o qual limita a sua absorção e o alcance de concentrações terapêuticas. Desta maneira, o objetivo deste trabalho foi desenvolver sistemas de liberação nanoestruturados mucoadesivos para a administração nasal do AE, com vistas ao aproveitamento do seu potencial terapêutico para o tratamento da Doença de Alzheimer. As nanoemulsões foram preparadas pela técnica de emulsificação espontânea. Inicialmente, várias concentrações do lipídeo catiônico (oleilamina ou estearilamina) foram testadas a fim de obter nanoemulsões catiônicas. Do mesmo modo, foi avaliado o tipo e concentração do óleo e de lecitina. O tamanho, o pH e o potencial zeta das gotículas foram afetados pela composição das formulações. Para a quantificação do AE, uma metodologia por espectroscopia de fluorescência foi desenvolvida e validada. O teor de AE variou entre 0,27 e 0,36 mg/mL e a eficiência de encapsulação foi superior a 95,50% para todas as formulações. A capacidade antioxidante do AE livre e contido nas nanoemulsões catiônicas foi avaliada pelo método do DPPH, e não foi observada diferença estatística entre as amostras, indicando que a técnica de obtenção das nanoemulsões catiônicas não alterou a potência antioxidante do fármaco. O potencial mucoadesivo das nanoemulsões catiônicas foi avaliado após incubação das formulações com uma dispersão de mucina, e a diferença no potencial zeta e tamanho das nanoemulsões antes e depois da incubação com a mucina foram indicativos de mucoadesão. Estudos de permeação do AE através da mucosa nasal suína foram realizados usando células de Franz, e, para isso, uma metodologia analítica por cromatografia líquida de alta eficiência foi desenvolvida e validada. Os resultados mostraram que a massa permeada do AE contido nas nanoemulsões foi cerca de três vezes maior em relação àquela obtida para o fármaco livre. Estudos

farmacológicos em modelo comportamental da DA foram conduzidos após a infusão do peptídeo  $\beta$ -amilóide pela via intracerebroventricular em camundongos. O AE livre e na forma nanoemulsionada foi administrado por via oral e nasal e os resultados foram comparados. O AE livre na dose de 50 mg/kg e nanoemulsionado na dose de 3,37 mg/kg, ambos pela via oral, e o AE nanoemulsionado na dose de 64  $\mu$ g/kg por via nasal, foram capazes de diminuir o déficit cognitivo gerado nos animais pela infusão do peptídeo. Entretanto, análises bioquímicas mostraram apenas em um grupo foi possível observar o estresse oxidativo proporcionado pelo peptídeo, sendo este desequilíbrio oxidativo revertido pelo AE contido nas nanoemulsões. Os resultados sugerem que as nanoemulsões catiônicas constituem um veículo promissor para a administração do AE por via nasal. Finalmente, sistemas precursores de cristais líquidos compostos de misturas de PPG-5-CETETH-20, oleilamina e água foram estudados como um veículo alternativo para administração do AE. Para isso, um diagrama de fases ternário foi obtido a partir de misturas dos três componentes. O diagrama de fases evidenciou a região de formação de sistemas líquidos transparentes que, quando diluídos em água, sofrem alterações estruturais, tornando sistemas viscosos transparentes caracterizados por apresentar as mesofases lamelar e hexagonal. Tais sistemas foram caracterizados quanto às propriedades reológicas, perfil de textura e propriedades mucoadesivas. O AE foi incorporado ao sistema precursor de cristal líquido e a capacidade antioxidante foi avaliada pelo método de DPPH. A avaliação *in vitro* da atividade antioxidante do AE, assim como a análise cromatográfica indicou a ocorrência de interações ou a instabilidade do AE neste sistema, mas mais estudos seriam necessários para elucidar os fenômenos observados.

**Palavras-chave:** Ácido elágico, nanoemulsões catiônicas, oleilamina, Doença de Alzheimer, liberação nasal, cristais líquidos.

## ABSTRACT

Alzheimer's disease (AD) is a neurodegenerative disease characterized by a progressive decline in the number of cholinergic neurons, and it is the most common cause of cognitive impairment in individuals aged over 65 years old. Studies have shown that the use of polyphenolic compounds, such as ellagic acid, may be useful for the prophylactic and therapeutic treatment of AD. Ellagic acid (EA) is a dimeric derivative of gallic acid, which have demonstrated to possess several biological effects, such as antioxidant, antitumor, antimutagenic, antibacterial, and hypoglycemic activities. However, this drug displays a low oral bioavailability due to its poor water solubility and high colonic and hepatic metabolism, which prevents its use in clinic. Therefore, the aim of this study was to develop cationic nanoemulsions as a new delivery system for nasal administration of EA for the treatment of AD. The cationic nanoemulsions were prepared by the spontaneous emulsification technique. Firstly, several concentrations of the cationic lipids (stearylamine or oleylamine) were tested in order to obtain cationic nanoemulsions. Also, the effect of the concentration of MCT and lecithin on the nanoemulsion properties was evaluated. The droplet size, pH and zeta potential of nanoemulsions were dependent on the composition of the formulations. In order to determine the ellagic acid content in the nanoemulsions, a fluorescence spectrophotometric method was developed and validated. The EA content varied from 0.27 e 0.36 mg/mL and the encapsulation efficiency of this drug was above 95.5% for all formulations. The antioxidant activity of EA was determined by the DPPH method, and the results demonstrated that no statistical difference was found between the values obtained for EA alone and EA-loaded cationic nanoemulsions. This result indicated that the procedures used to prepare the nanoemulsions did not affect the antioxidant activity of EA. The mucoadhesive potential of the cationic nanoemulsions was evaluated after incubation of the formulations with a dispersion of mucin. The results of droplet size and zeta potential of nanoemulsions before and after incubation with mucin evidenced the mucoadhesive properties of this drug delivery system. Permeation studies of EA through porcine nasal mucosa were carried out using Franz diffusion cells. The amount of permeated and retained EA was determined by a HPLC method, previously developed and validated.

The amount of EA permeated through the nasal mucosa was about three times higher for EA-loaded nanoemulsions than for free drug. Pharmacological studies were conducted using a mouse model of Alzheimer's disease induced by the intracerebroventricular infusion of the  $\beta$ -amyloid peptide in mice. Free EA and EA-loaded cationic nanoemulsion were administered by the oral and nasal routes, and the results were statistically compared. When orally administered, the free drug at the dose of 50 mg/kg and the EA-loaded nanoemulsion at dose of 3.37 mg/kg were able to reduce the cognitive deficit caused by the infusion of the peptide. Similar result was obtained when EA-loaded nanoemulsions were administered by the nasal route at dose of 64  $\mu$ g/kg. However, biochemical analyses showed that the oxidative stress provided by the infusion of the peptide occurred only in one of the animal groups, and this effect was reversed by ellagic acid loaded in cationic nanoemulsions. The results suggested that the cationic nanoemulsions developed in this study constitutes a potential nasal delivery system for ellagic acid. Finally, mucoadhesive precursor systems of liquid crystals composed by mixtures of PPG-5-CETEH-20, oleylamine and water were studied as an alternative vehicle for administration of EA. The construction of a ternary diagram allowed to verify the region where optically systems were formed. After dilution with water, these systems undergone structural changes, becoming optically clear semisolid systems characterized by the presence of lamellar and hexagonal mesophases. These systems were characterized according to its rheological properties, texture profiles, and mucoadhesive properties. Ellagic acid was incorporated into the precursor systems of liquid crystals and the antioxidant ability was evaluated by the DPPH method. The evaluation of the in vitro antioxidant activity of ellagic acid, as well as the chromatographic analysis indicated that EA may be incompatible or unstable in the presence of the components of this formulations, but additional studies would be need to elucidate these phenomena.

**Key-words:** Ellagic acid, cationic nanoemulsions, oleylamine, alzheimer disease, nasal drug delivery, liquid crystals.

## LISTA DE FIGURAS

<b>CAPÍTULO 1: REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	35
<b>Figura 1.1:</b> Processamento da proteína precursora de amilóide (APP), mostrando as vias fisiológica e amiloidogênica. As mutações na APP culminam na produção do peptídeo (A $\beta$ ) e sua agregação é favorecida pelas mutações na ApoE4, desencadeando a formação dos emaranhados neurofibrilares e placas senis.....	37
<b>Figura 1.2:</b> Liberação e captação da acetilcolina (ACh) nas sinapses nervosas.....	38
<b>Figura 1.3:</b> Redução tetravalente do oxigênio molecular (O <sub>2</sub> ) na mitocôndria até a formação de água (H <sub>2</sub> O), resultando na formação de espécies reativas de oxigênio superóxido, peróxido de hidrogênio e o radical hidroxila. ....	40
<b>Figura 1.4:</b> Etapas de um elétron na redução do oxigênio, levando à formação das espécies reativas de oxigênio superóxido, peróxido de hidrogênio e o radical hidroxila.....	41
<b>Figura 1.6:</b> Possível envolvimento do envelhecimento, de anormalidades mitocondriais, lesão cerebral, da PPA (proteína precursora de amilóide), e de filamentos helicoidais pareados na morte celular induzida por estresse oxidativo na DA. As EROs podem ativar as $\beta$ -secretase e $\delta$ -secretase, aumentando a produção de agregados a partir do PPA, que diretamente induz a produção de EROs. Os agregados também podem induzir as alterações mitocondriais, que aumentam ainda mais a produção de EROs. Estas EROs reagem com lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos, levando à morte celular na DA. EROs também podem	

ativar proteínas quinases, levando à fosforilação da Tau e à formação dos emaranhados neurofibrilares, o que produz mais EROs, resultando em morte celular. .... 43

**Figura 1.7:** A enzima superóxido dismutase converte o íon superóxido em peróxido de hidrogênio e a enzima catalase, por sua vez, transforma o peróxido de hidrogênio em água e oxigênio, protegendo as células do dano oxidativo..... 44

**Figura 1.8:** A glutaciona-peroxidase reduz o peróxido de hidrogênio a água e a glutaciona redutase regenera a glutaciona reduzida. .... 45

**Figura 1.9:** Reação de lipoperoxidação em cadeia realizada por radicais livres. (A) Etapa de iniciação por um radical hidroxil ou outro radical que retira um átomo de hidrogênio de um lipídeo poli-insaturado (LH), com a formação de um radical lipídico (L•); (B) etapa de propagação pela reação com O<sub>2</sub>, com formação de um radical peróxi lipídico (LOO•) e um peróxido lipídico (LOOH); (C) etapa de terminação da lipoperoxidação; (D) formação do malondealdeído, 4-hidroialdeído e 2-aldeído..... 47

**Figura 1.10:** Classificação e estrutura de alguns polifenóis naturais... 52

**Figura 1.11:** Principais classes de polifenóis e compostos relacionados. .... 53

**Figura 1.12:** Estrutura química do ácido elágico (2,3,7,8-tetrahidroxi[1]benzopirano[5,4,3-cde][1]benzopiran-5,10-diona) ..... 54

**Figura 1.13:** Representação esquemática de algumas estruturas possíveis de serem formadas por misturas de água, óleo e tensoativo.. 59

**Figura 1.14:** Esquema ilustrando as possíveis localização dos fármacos dependendo das características de solubilidade, nas estruturas de (a) fase cúbica reversa e (b), mesofases hexagonal reversa. .... 63

**Figura 1.15:** Diagrama de um capilar cerebral que forma a BHE em associação com os astrócitos e células da glia. As principais vias para o transporte de moléculas através da BHE encontram-se demonstrados. (1) via intercelular, cujo transporte de compostos hidrofílicos, incluindo fármacos polares é limitado, devido à presença das junções oclusivas; (2) transcitose adsortiva, que é um mecanismo de transcitose e endocitose mediado por processos de adsorção, responsável, por exemplo, pela passagem de proteínas plasmáticas como a albumina para o cérebro; (3) Proteínas de transporte, as células endoteliais possuem carreadores proteicos para colina, aminoácidos, glicose, purina e nucleotídeos; (4) via transcelular, é uma via de difusão efetiva para compostos lipofílicos (5) transcitose mediada por receptor, transporte por endocitose e transcitose mediado por receptores específicos para certas proteínas, como insulina e transferrina. .... 67

**Figura 1.16:** Representação esquemática de uma secção sagital da cavidade nasal humana mostrando: (A) vestíbulo nasal, (B) átrio, (C) região respiratória, (C1) corneto inferior (C2) corneto médio, e (C3) corneto superior (D) região olfatória e (E) nasofaringe. .... 69

**Figura 1.17:** Representação do epitélio nasal mostrando: (A) células ciliadas, (B) células não ciliadas, (C) células caliciformes, (D) camada de muco gel, (E) camada de muco sol, (F) células basais, e (G) membrana basal..... 70

**Figura 1.18:** No sistema olfatório humano, o bulbo olfatório (A) processa e distribui as informações olfativas para o cérebro, onde ocorre a codificação. Esta comunicação íntima do bulbo olfatório com a cavidade nasal permite que a administração de fármacos pela via nasal (B) consiga alcançar o SNC. .... 71

**Figura 2.1:** Efeito da concentração de TCM, do tipo e concentração do lipídeo catiônico sobre o tamanho médio das gotículas nas nanoemulsões isentas de fármaco. (A) Nanoemulsões preparadas com estearilamina, (B) nanoemulsões preparadas com oleilamina. Barras pretas: 4% de TCM. Barras brancas: 8% (m/m) de TCM. .... 94

**Figura 2.2:** Efeito da concentração de TCM e do tipo e concentração do lipídeo catiônico sobre o potencial zeta nanoemulsões brancas (sem fármaco). (A) Nanoemulsões preparadas com estearilamina, (B) nanoemulsões preparadas com oleilamina. Barras pretas: 4% (m/m) de TCM. .... 96

**Figura 2.3:** Efeito da concentração de TCM e da concentração de oleilamina sobre (A) tamanho médio e (B) potencial zeta das nanoemulsões contendo ácido elágico. .... 98

**Figura 2.4:** Caracterização das nanoemulsões quanto ao pH, isentas de fármaco (A) e contendo AE (B) em dois níveis de concentração de TCM. .... 100

**Figura 2.6:** Fotomicrografia obtidas por MET das nanoemulsões contendo ácido elágico, onde (A)  $NE_{OA(4\%, 0,05 \text{ mM})}$ , (B)  $NE_{OA(8\%, 0,05 \text{ mM})}$ , (C)  $NE_{OA(4\%, 0,01 \text{ mM})}$ , (D)  $NE_{OA(8\%, 0,01 \text{ mM})}$ , (E)  $NE_{(4\%, 0 \text{ mM})}$  e (F)  $NE_{(8\%, 0 \text{ mM})}$ , coradas com ácido fosfotúngstico. .... 104

<b>Figura 2.7:</b> Espectros de fluorescência obtidos na análise da (A) solução padrão do ácido elágico 3,0 µg/mL, (B) nanoemulsão contendo ácido elágico NE <sub>AO</sub> (8%, 0,01 mM) (1,5 µg/mL); (C) nanoemulsão branca (com oleilamina ou estearilamina). As análises foram realizadas em comprimento de onda de excitação de 388 nm e emissão de 459 nm. Os slits de excitação e emissão dos monocromadores foram ajustados para 5 e 2,5 respectivamente. ....	106
<b>Figura 2.8:</b> Curva de calibração de ácido elágico obtida por espectroscopia de fluorescência, utilizando comprimento de onda de excitação de 388 nm e emissão de 459 nm .....	107
<b>Figura 2.9:</b> Avaliação da capacidade antioxidante do ácido elágico isolado e nas nanoemulsões em função do percentual de inibição de formação do radical DPPH.....	113
<b>Figura 2.10:</b> Valores de CA <sub>50</sub> (concentração de antioxidante capaz de inibir a formação do radical DPPH em 50%) obtidos para o ácido ascórbico (AA), ácido elágico (AE) e para as nanoemulsões catiônicas contendo ácido elágico preparadas em diferentes concentrações de oleilamina.....	114
<b>Figura 2.11:</b> Variação do diâmetro hidrodinâmico (A) e potencial zeta (B) de uma dispersão de mucina (250µg/mL) em contato com nanoemulsões catiônica NE <sub>OA</sub> (4%,0 mM), NE <sub>OA</sub> (4%,0,01 mM) e NE <sub>OA</sub> (4%,0,05 mM). ....	116
<b>Figura 2.12:</b> Cromatogramas obtidos após análise por CLAE das seguintes amostras: (A) solução tampão fosfato pH 6,4:PEG 400 (60:40, m/m) usada como meio acceptor contendo nanoemulsão catiônica branca (NE <sub>OA</sub> 4%, 0,05 mM) submetida ao ensaio de permeação, (B) solução	

tampão fosfato pH 6,4:PEG 400 (60:40, m/m) com solução padrão de ácido elágico (1 µg/mL).....	118
<b>Figura 2.13:</b> Cromatogramas obtidos após análise por CLAE das seguintes amostras: (A) metanol usado como meio extrator contendo nanoemulsão catiônica branca (NE <sub>OA</sub> 4%, 0,05 mM) submetida ao ensaio de permeação, (B) solução padrão de ácido elágico (1 µg/mL) diluído em metanol.....	119
<b>Figura 2.14:</b> Curva de calibração do ácido elágico obtida por CLAE em meio tampão fosfato pH 6,4:PEG 400 (60:40, m/m) para estudo de permeação na faixa de concentração de 0,1 a 10 µg/mL. ....	120
<b>Figura 2.15:</b> Curva de calibração do ácido elágico obtida por CLAE em meio extrator (metanol) para estudo de retenção do fármaco na mucosa nasal, na faixa de concentração de 0,1 a 10 µg/mL. ....	121
<b>Figura 2.16:</b> Perfil de permeação do ácido elágico livre e contido em nanoemulsões através da mucosa nasal suína. ....	125
<b>Figura 2.17:</b> Massa de ácido elágico por área retido na mucosa nasal suína em estudo de permeação em célula do tipo Franz. ....	126
<b>Figura 3.1:</b> Cronograma de execução dos testes comportamentais e análises bioquímicas .....	136
<b>Figura 3.2:</b> Representação esquemática do teste de realocação de objetos. Onde o índice de localização de objetos é dado pelo tempo (s) objeto realocado x 100/ tempo (s) objeto realocado + tempo (s) objeto encontrado no local do treino.....	138
<b>Figura 3.3:</b> Distância percorrida pelos camundongos no teste do campo aberto durante 3 minutos. Onde: (A) dose de 20 mg/kg de AE em suspensão, (B) 50 mg/kg de AE em suspensão, (C) NE <sub>OA</sub> (4%, 0,05mM)	

(3,37 mg/kg) por via oral e (D) NE<sub>OA</sub> (4%, 0,05mM) (64 µg/kg) pela via nasal ..... 145

**Figura 3.4:** Tempo de exploração do objeto no treino de realocação de objeto. Onde (A) representa o grupo tratado com AE na dose de 20 mg/kg em suspensão, (B) com 50 mg/kg de AE em suspensão, (C) grupo tratado com a NE<sub>OA</sub> (4%, 0,05mM) via oral (3,37mg/kg) e (D) NE<sub>OA</sub> (4%, 0,05mM) (aproximadamente 64 µg/mL) pela via nasal ..... 146

**Figura 3.5:** Tempo de exploração do objeto deslocado no teste de realocação de objeto com reexposição de 90 minutos. Onde (A) representa o grupo tratado com AE na dose de 20 mg/kg, (B) com 50 mg/kg (C) grupo tratado com a NE<sub>OA</sub> (4%, 0,05mM) via oral (3,37mg/kg) e (D) NE<sub>OA</sub> (4%, 0,05mM) (aproximadamente 64 µg/mL). O teste foi avaliado através do teste t de student (%50 de investigação objeto realocado). 148

**Figura 3.6:** Tempo de imobilidade dos camundongos no teste de suspensão pela cauda durante 6 minutos. Onde (A) representa o grupo tratado com AE na dose de 20 mg/kg em suspensão, (B) com 50 mg/kg de AE em suspensão, (C) grupo tratado com a NE<sub>OA</sub> (4%, 0,05mM) via oral (3,37mg/kg) e (D) NE<sub>OA</sub> (4%, 0,05mM) via nasal (aproximadamente 64 µg/mL) ..... 149

**Figura 3.7:** Representa informações sobre o teste do labirinto aquático, onde (A) representa o tempo em que o animal permaneceu no quadrante correto, (B) denota o número de entradas na plataforma, (C) o tempo gasto pelo animal no quadrante oposto ao correto, (D) média da latência dos animais frente ao treino ..... 150

**Figura 3.8:** Percentual de entradas nos braços abertos no teste do labirinto em cruz elevado, onde (A) administração de AE dose de 50

mg/kg em suspensão, (B) grupo tratado com a NE<sub>OA</sub> (4%, 0,05mM) via oral (3,37 mg/kg) e (C) NE<sub>OA</sub> (4%, 0,05mM) via nasal (aproximadamente 64 µg/mL). ..... 151

**Figura 3.9:** Ensaio dos tióis não protéicos expresso em nmol de GSH/mg de proteína no córtex pré-frontal de camundongos onde (A) representa o grupo tratado com AE na dose de 20 mg/kg, (B) com 50 mg/kg, (C) grupo tratado com a NE<sub>OA</sub> (4%, 0,05mM) via oral (3,37mg/kg) e (D) NE<sub>OA</sub> (4%, 0,05mM) via nasal (aproximadamente 64 µg/mL) ..... 153

**Figura 3.10:** Ensaio para quantificação dos níveis de lipoperoxidação tecidual (TBARS) no córtex pré-frontal de camundongos expresso em nmol de malondealdeído/mg de proteína onde (A) representa o grupo tratado com 50 mg/kg, (B) grupo tratado com a NE<sub>OA</sub> (4%, 0,05mM) via oral (3,37mg/kg) e (C) NE<sub>OA</sub> (4%, 0,05mM) via nasal (aproximadamente 64 µg/mL). ..... 154

**Figura 3.11:** Ensaio para quantificação dos níveis de lipoperoxidação tecidual (TBARS) no hipocampo de camundongos expresso em nmol de malondealdeído/mg de proteína onde (A) representa o grupo tratado com 50 mg/kg, (B) grupo tratado com a NE<sub>OA</sub> (4%, 0,05mM) via oral (3,37mg/kg) e (C) NE<sub>OA</sub> (4%, 0,05mM) via nasal (aproximadamente 64 µg/mL).. ..... 155

**Figura 3.12:** Ensaio para quantificação da enzima glutaciona redutase no córtex pré-frontal de camundongos expresso em nmol de NADPH oxidado/minuto/mg de proteína onde (A) representa o grupo tratado com AE na dose de 20 mg/kg de AE em suspensão por via oral, (B) com 50 mg/kg de AE em suspensão por via oral, (C) grupo tratado com a NE<sub>OA</sub>

(4%, 0,05mM) via oral (3,37 mg/kg) e (D) NE<sub>OA</sub> (4%, 0,05mM) via nasal (aproximadamente 64 µg/mL)..... 156

**Figura 3.13:** Ensaio para quantificação da enzima glutathiona redutase no hipocampo de camundongos expresso em nmol de NADPH oxidado/minuto/mg de proteína onde (A) representa o grupo tratado com AE na dose de 20 mg/kg de AE em suspensão por via oral, (B) com 50 mg/kg de AE em suspensão por via oral, (C) grupo tratado com a NE<sub>OA</sub> (4%, 0,05mM) via oral (3,37mg/kg) e (D) NE<sub>OA</sub> (4%, 0,05mM) via nasal (aproximadamente 64 µg/mL)..... 157

**Figura 3.14:** Ensaio para determinação da atividade da enzima glutathiona peroxidase no córtex pré-frontal de camundongos expresso em nmol de NADPH oxidado/minuto/mg de proteína onde onde (A) representa o grupo tratado com AE na dose de 20 mg/kg em suspensão por via oral, (B) com 50 mg/kg de AE em suspensão por via oral, (C) grupo tratado com a NE<sub>OA</sub> (4%, 0,05mM) via oral (3,37mg/kg) e (D) NE<sub>OA</sub> (4%, 0,05mM) via nasal (aproximadamente 64 µg/mL). ..... 158

**Figura 3.15:** Ensaio para determinação da atividade da enzima glutathiona peroxidase no hipocampo de camundongos expresso em nmol de NADPH oxidado/minuto/mg de proteína onde onde (A) representa o grupo tratado com AE na dose de 20 mg/kg em suspensão por via oral, (B) com 50 mg/kg de AE em suspensão por via oral, (C) grupo tratado com a NE<sub>OA</sub> (4%, 0,05mM) via oral (3,37mg/kg) e (D) NE<sub>OA</sub> (4%, 0,05mM) via nasal (aproximadamente 64 µg/mL). ..... 159

**Figura 3.16:** Ensaio para determinação da atividade da enzima catalase no córtex pré-frontal de camundongos expresso em µmol de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> /minuto/mg de proteína onde (A) representa o grupo tratado com AE na

dose de 50 mg/kg em suspensão por via oral, (B) grupo tratado com a NE<sub>OA</sub> (4%, 0,05mM) via oral (3,37 mg/kg) e (C) NE<sub>OA</sub> (4%, 0,05mM) via nasal (aproximadamente 64 µg/mL) ..... 160

**Figura 3.17:** Ensaio para determinação da atividade da enzima catalase no hipocampo de camundongos expresso em µmol de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> /minuto/mg de proteína onde (A) representa o grupo tratado com AE na dose de 50 mg/kg em suspensão por via oral, (B) grupo tratado com a NE<sub>OA</sub> (4%, 0,05mM) via oral (3,37 mg/kg) e (C) NE<sub>OA</sub> (4%, 0,05mM) via nasal (aproximadamente 64 µg/mL). O teste foi avaliado através da análise de variância (ANOVA)..... 161

**Figura 3.18:** Ensaio para quantificação da enzima acetilcolinesterase no córtex pré-frontal de camundongos expresso em nmol/minuto/mg de proteína onde (A) representa o grupo tratado com 50 mg/kg, (B) grupo tratado com a NE<sub>OA</sub> (4%, 0,05mM) via oral (3,37 mg/kg) e (C) NE<sub>OA</sub> (4%, 0,05mM) via nasal (aproximadamente 64 µg/mL) ..... 162

**Figura 3.19:** Ensaio para quantificação da enzima acetilcolinesterase no hipocampo de camundongos expresso em nmol/minuto/mg de proteína onde (A) representa o grupo tratado com 50 mg/kg, (B) grupo tratado com a NE<sub>OA</sub> (4%, 0,05mM) via oral (3,37 mg/kg) e (C) NE<sub>OA</sub> (4%, 0,05mM) via nasal (aproximadamente 64 µg/mL) ..... 163

**Figura 3.20:** Incorporação de Iodeto de propídeo em fatias de hipocampo de camundongos expresso em incorporação de iodeto de propídeo onde (A) representa o grupo tratado com 50 mg/kg, (B) grupo tratado com a NE<sub>OA</sub> (4%, 0,05mM) via oral (3,37mg/kg) e (C) NE<sub>OA</sub> (4%, 0,05mM) via nasal (aproximadamente 64 µg/mL) ..... 164

<b>Figura 4.1:</b> Esquema ilustrando o método da titulação aquosa para a construção do diagrama ternário de fases PPG-5-CETETH-20:OA:Água.....	174
<b>Figura 4.2:</b> Diagrama de fases ternário obtido com a combinação de PPG-5-CETETH-20, oleilamina e água. No diagrama: F1 <sub>(T35, O45, A20)</sub> , F2 <sub>(T22, O30, A48)</sub> , F3 <sub>(T14, O18, A68)</sub> e F4 <sub>(T10, O12, A78)</sub> .....	179
<b>Figura 4.3:</b> Imagens obtidas por MLP das formulações F2 <sub>(T22, O30, A48)</sub> , F3 <sub>(T14, O18, A68)</sub> e F4 <sub>(T10, O12, A78)</sub> onde F2 apresenta uma mistura das duas fases hexagonal e lamelar, F3 é possível identificar as cruces de malta ou aspecto de mosaico, características da fase lamelar e F4 pode ser classificadas como fases hexagonais, pois é possível identificar as estrias características desta mesofase. ....	181
<b>Figura 4.4:</b> Curvas de fluxo obtidas para as formulações F1 <sub>(T35, O45, A20)</sub> , F2 <sub>(T22, O30, A48)</sub> , F3 <sub>(T14, O18, A68)</sub> , F4 <sub>(T10, O12, A78)</sub> a 25°C .....	184
<b>Figura 4.5:</b> Valores de índice de consistência (k) e índice de fluxo (n) calculados a partir da aplicação da lei das potências nas curvas de fluxo obtidas para as diferentes formulações.....	185
<b>Figura 4.6:</b> Parâmetros de dureza, resistência à compressão, adesão e coesão das amostras, após a diluição de F1 com água (A) e fluido nasal simulado (FNS). ....	186
<b>Figura 4.7:</b> Valores de pico de mucoadesão (P <sub>MA</sub> ) e trabalho de mucoadesão (T <sub>MA</sub> ) obtidas para as amostras diluídas em água e fluido nasal simulado (FNS), utilizando mucosa nasal suína e disco de mucina como modelos de membrana (n=3). ....	189

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.1:</b> Papel das EROs em várias doenças.....	42
<b>Tabela 2.1:</b> Diluições realizadas para o ensaio de exatidão onde com a nanoemulsão catiônica NEOA <sub>(8%, 0,01 mM)</sub> .....	85
<b>Tabela 2.2:</b> Parâmetros de robustez avaliados para a validação do método espectrofluorimétrico para determinação do ácido elágico nas nanoemulsões catiônicas por espectrofluorimetria. ....	86
<b>Tabela 2.3:</b> Composição das formulações de nanoemulsões catiônicas. ....	93
<b>Tabela 2.4:</b> Valores experimentais obtidos na avaliação precisão intradia e interdia do método. ....	108
<b>Tabela 2.5:</b> Valores obtidos na avaliação da exatidão do método de análise do AE por espectrofluorimetria.....	109
<b>Tabela 2.6:</b> Valores de intensidade de fluorescência de excitação obtidos na avaliação da robustez do método analítico. ....	110
<b>Tabela 2.7:</b> Valores de teor (mg/mL), eficiência de encapsulação (EE, %) e recuperação (R, %) de ácido elágico nas nanoemulsões catiônicas em função da concentração de TCM e oleilamina. ....	111
<b>Tabela 2.8:</b> Resultados obtidos na repetibilidade (precisão intradia) e precisão intermediária (interdia) e do método de quantificação do ácido elágico no meio acceptor por CLAE após 12 horas de estudo de permeação. ....	122
<b>Tabela 2.9:</b> Resultados obtidos na repetibilidade (precisão intradia) e precisão intermediária (interdia) do método de quantificação do ácido	

elágico no meio extrator por CLAE, após 12 horas de estudo de permeação. .... 123

**Tabela 2.10:** Resultados obtidos na exatidão do método de quantificação de ácido elágico contido nas nanoemulsões catiônicas dissolvido em meio acceptor (tampão fosfato pH 6,4 e PEG 400 40%) e extrator (metanol) submetido à 12 horas de estudo de permeação. .... 124

**Tabela 4.1:** Proporções de tensoativo (PPG-5-CETETH-20), oleilamina e água selecionadas no diagrama ternário de fases. .... 180

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A $\beta$ <sub>1-40</sub> – Peptídeo  $\beta$ -amilóide humano  
A $\beta$  – Peptídeo  $\beta$ -amilóide  
ACh – Acetilcolina  
AChE – Acetilcolinesterase  
AE – Ácido elágico  
ANOVA – Análise de variância  
ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária  
APP – Proteína precursora amiloide  
ATP – Adenosina trifosfato  
BHE – Barreira hematoencefálica  
BLE – Barreira líquido-encefálica  
Borax – Borato de sódio  
CA<sub>50</sub> – quantidade de antioxidante necessária para decrescer a concentração inicial de DPPH em 50%  
CAT – Catalase  
CL – Cristal líquido  
CLAE – Cromatografia de alta eficiência  
CTAB – do Inglês Hexadecyltrimethylammonium bromide, Brometo de cetil trimetil amonio  
DA – Doença de Alzheimer  
DNA – Ácido desoxirribonucleico  
DP – Desvio padrão  
DPR – Desvio padrão relativo  
DPPH – 2,2-difenil-1-picril-hidrazila  
EA – Estearilamina  
EE, % – Eficiência de encapsulação, %  
ERO – Espécies reativas de oxigênio  
FNS – Fluido nasal simulado  
FT-IR – Infravermelho com transformada de Fourier  
GPx – Glutaciona peroxidase  
GR – Glutaciona redutase  
GSH – Glutaciona  
GSSG – Glutaciona oxidada  
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – Peróxido de hidrogênio  
ICV – Intracerebroventricular

ICH – International Conference on Harmonisation  
IP – Iodeto de propídeo  
LD – Limite de detecção  
LQ – Limite de quantificação  
LT – Líquido transparente MDA – Malondealdeído  
ME - Microemulsão  
MET – Microscopia eletrônica de transmissão  
MLP – Microscópio de luz polarizada  
NE – Nanoemulsão  
NE<sub>EA</sub> – Nanoemulsão contendo estearilamina  
NE<sub>OA</sub> – Nanoemulsão contendo oleilamina  
NPSH – Níveis de tióis não proteicos  
OA – Oleilamina  
P<sub>MA</sub> – Pico de mucoadesão  
PPG-5-CETETH20 - Álcool cetílico etoxilado 20 OE e propoxilado 5  
OP  
SEM - do Inglês Standard Error of the Mean, Erro Padrão de Média  
SF – Separação de fases  
SLT – Sistema líquido transparente  
SNC – Sistema nervoso central  
STV – Sistema transparente viscoso  
SO – Sistema opaco  
SOD – Superóxido dismutase  
TBARS – Ensaio de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico  
TCM – Triglicerídeos de cadeia média  
T<sub>MA</sub> – Trabalho de mucoadesão  
TPA – do Inglês Texture Profile Analysis, Análise do perfil de Textura

## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>29</b>
<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>34</b>
Objetivo geral.....	34
Objetivos específicos .....	34
1.1 Doença de Alzheimer.....	36
1.1.1 Estresse oxidativo e a doença de Alzheimer .....	39
1.1.2 Mecanismos de defesa antioxidante e biomarcadores de oxidação na doença de Alzheimer.....	44
1.1.3 Prevalência e tratamento da DA.....	49
1.2 Polifenóis .....	50
1.2.1 Ácido Elágico.....	54
1.3 Sistemas estabilizados por tensoativos.....	58
1.3.1 Microemulsões e Nanoemulsões.....	59
1.3.2 Cristais líquidos .....	61
1.4 Sistemas de liberação de fármacos para o SNC.....	65
1.5 Administração de fármacos pela via nasal .....	68
<b>CAPÍTULO 2: DESENVOLVIMENTO DE NANOEMULSÕES CATIONICAS DE ÁCIDO ELÁGICO E AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES MUCOADESIVAS E DA PERMEAÇÃO ATRAVÉS DA MUCOSA NASAL .....</b>	<b>75</b>
2.1 Introdução .....	76
2.2 Materiais .....	79
2.2.1 Materias primas.....	79
2.2.2 Solventes e reagentes .....	79

2.2.3 Equipamentos .....	79
2.3 Metodologia .....	81
2.3.1 Preparação das nanoemulsões catiônicas .....	81
2.3.2 Caracterização físico-química e morfológica das nanoemulsões .	81
2.3.3 Determinação do teor e eficiência de encapsulação do ácido elágico nas nanoemulsões catiônicas .....	82
2.3.4 Avaliação de atividade antioxidante <i>in vitro</i> .....	87
2.3.5 Avaliação das interações entre a mucina e as nanoemulsões catiônicas.....	87
2.3.6 Estudos de permeação nasal <i>in vitro</i> .....	88
2.4 Resultados e discussão .....	92
2.4.1 Preparação e caracterização das nanoemulsões catiônicas.....	92
2.4.2 Espectroscopia de Absorção no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR).....	100
2.4.3 Avaliação morfológica das nanoemulsões .....	103
2.4.4 Determinação do teor e eficiência de encapsulação do ácido elágico nas nanoemulsões catiônicas .....	105
2.4.5 Avaliação da atividade antioxidante do ácido elágico <i>in vitro</i> (DPPH).....	112
2.4.6 Avaliação da interação das nanoemulsões catiônicas com a mucina .....	114
2.4.7 Estudos de permeação <i>in vitro</i> do ácido elágico através da mucosa nasal .....	116

### **CAPÍTULO 3: AVALIAÇÃO FARMACOLÓGICA DA ADMINISTRAÇÃO INTRANASAL E ORAL DO ÁCIDO ELÁGICO, ISOLADAMENTE OU EM SISTEMAS**

**NANOEMULSIONADOS, EM UM MODELO EXPERIMENTAL DA DOENÇA DE ALZHEIMER EM CAMUNDONGOS ..... 130**

3.1 Introdução .....	131
3.2 Materiais .....	134
3.2.1 Materias primas.....	134
3.2.2 Solventes e reagentes .....	134
3.2.3 Equipamentos.....	134
3.2.4 Animais.....	135
3.3 Métodos .....	136
3.3.1 Administração do ácido elágico e cronograma dos ensaios .....	136
3.3.2 Modelo experimental <i>in vivo</i> da doença de Alzheimer .....	136
3.4 Resultados.....	144
3.4.1 Testes comportamentais.....	144
3.4.2 Marcadores bioquímicos de estresse oxidativo.....	151

**CAPÍTULO 4: DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO E INCORPORAÇÃO DO ÁCIDO ELÁGICO EM SISTEMAS NANOESTRUTURADOS A PARTIR DE MISTURAS TERNÁRIAS DE OLEILAMINA/PPG-5-CETETH-20/ÁGUA... 169**

4.1 Introdução .....	170
4.2 Materiais .....	172
4.2.1 Materiais .....	172
4.2.2 Solventes e regentes .....	172
4.2.3 Equipamentos.....	172
4.3 Metodologia .....	173
4.3.1 Construção do diagrama de fases ternário do sistema contendo PPG-5-CETETH-20, oleilamina (OA) e água .....	173

4.3.2 Caracterização dos sistemas contendo PPG-5-CETETH-20, oleilamina e água.....	174
4.4 Resultados e Discussão .....	178
4.4.1 Construção do diagrama de fases ternário com a combinação de PPG-5-CETETH-20, oleilamina e água.....	178
4.4.2 Análise reológica dos sistemas PPG-5-CETETH-20/AO/água.....	182
4.4.3 Avaliação do perfil de textura (TPA) dos sistemas em contato com FNS e água.....	185
4.4.4 Avaliação da força mucoadesiva.....	187
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>200</b>



## INTRODUÇÃO

Desde o início do século passado, mas principalmente nas últimas duas décadas, a humanidade vem passando por uma transição demográfica evidente, sendo que as sociedades estão deixando de ser formadas predominantemente por populações jovens e maduras para transformarem-se em sociedades compostas por pessoas cada vez mais idosas (IBGE, 2012). Embora estes dados reflitam um claro avanço na qualidade de vida de parte da população, eles também alertam para a possibilidade de que num futuro próximo, cresça significativamente o número de pessoas acometidas pelos chamados “males da idade”. Dentre tais patologias, destaca-se a doença de Alzheimer, uma doença neurodegenerativa caracterizada pelo declínio progressivo no número de neurônios colinérgicos, principalmente, do prosencéfalo basal para áreas corticais e formação hipocampal, sendo a causa mais comum de prejuízos cognitivos em indivíduos com mais de 65 anos de idade (GALLAGHER, COLOMBO, 1995).

As principais alterações neuropatológicas verificadas no cérebro de portadores da doença de Alzheimer incluem a formação de placas senis e o aparecimento de emaranhados neurofibrilares. As placas senis são caracterizadas pelo acúmulo de depósitos de proteínas amilóides insolúveis, constituídos primariamente da proteína  $\beta$ -amilóide, um peptídeo formado por 40-42 aminoácidos e derivado de uma glicoproteína transmembranar muito maior, a proteína precursora amilóide (APP) (SISODIA, PRICE, 1995; SELKOE, 1999). A doença de Alzheimer é tida como a maior causa de morbidade entre idosos, sendo a causa mais comum de demência no idoso, com apresentação clínica e patológica bem definidas, afetando pelo menos 5% dos indivíduos com mais de 65 anos e 20% daqueles com mais de 80 anos (ABREU, FORLENZA, BARROS, 2005). Apresenta como sintomatologia: perda da memória, desorientação espacial e diminuição da capacidade intelectual (MEDEIROS et al., 2007), fazendo com que o indivíduo necessite de auxílio de um cuidador em todas as tarefas habituais, o que origina um elevado custo dos serviços para os familiares. Assim, estudos sobre o Alzheimer têm ganhado grande destaque no sentido de reverter ou estagnar o avanço da doença.

Nos últimos anos, estudos têm sido realizados visando a avaliação de compostos polifenólicos no tratamento profilático e terapêutico da doença de Alzheimer (RATNAM et al., 2006). Compostos polifenólicos, em geral, têm mostrado potente atividade anti-amilodogênica e protetora contra a neurotoxicidade da  $\beta$ -amilóide. Entre os compostos polifenólicos testados está o ácido elágico, um derivado dimérico do ácido gálico, naturalmente encontrado em diversas frutas como framboesa, romã vermelha, morango, mirtilo e nozes, e conhecido por possuir diversas atividades biológicas, tais como, antioxidante, antitumoral, antimutagênica, hipoglicemiante e antibacteriana (WHITLEY et al., 2003). Hartman e colaboradores (2006) mostraram que o tratamento em camundongos transgênicos que expressam uma forma da proteína precursora de amiloide com suco de romã proporcionou melhorias na aprendizagem espacial, além de reduzir significativamente o acúmulo da proteína A $\beta$ 42 solúvel e a deposição da amilóide no hipocampo, quando comparado com os animais do grupo controle. Igualmente, estudos na linhagem de células de neurônios SH-SY5Y, evidenciaram que o ácido elágico reduz significativamente a neurocitotoxicidade induzida pela  $\beta$ -amilóide A $\beta$ 42 (FENG et al., 2009). Tais estudos sugerem, portanto, que esta substância apresenta potencial terapêutico para o tratamento da doença de Alzheimer.

Apesar dos benefícios farmacológicos apresentados pelo ácido elágico, esta substância é caracterizada por uma baixa solubilidade aquosa e elevado metabolismo pré-sistêmico, os quais limitam a sua absorção e o alcance de concentrações plasmáticas terapêuticas (MURUGAN et al., 2009). Além disso, o ácido elágico se acumula no epitélio do trato gastrointestinal devido a sua extensa ligação com as proteínas e ADN, impedindo a sua passagem para a circulação sanguínea e resultando em uma baixa biodisponibilidade após administração oral (WHITLEY et al., 2003). Neste sentido, a administração nasal oferece uma alternativa para contornar as limitações da via oral para administração do ácido elágico. A via nasal tem a vantagem de ser uma via não invasiva, de fácil aplicação e rápida absorção (COSTANTINO et al., 2007). Além disto, no que diz respeito ao tratamento de doenças neurológicas, a via nasal oferece um acesso direto de substâncias bioativas ao cérebro, através da região olfatória localizada no teto da cavidade nasal, contornando não somente o metabolismo pré-sistêmico, como também a barreira hematoencefálica, a qual é altamente seletiva a substâncias, e impede o alcance de

fármacos no sistema nervoso central (WATTANATHORN et al., 2007; PIRES et al., 2009; TONG-UM et al., 2010).

Por outro lado, uma característica importante da cavidade nasal é o fato do seu epitélio ser revestido com uma fina camada de muco com espessura de cerca de 5  $\mu\text{m}$  secretado pelas células caliciformes. O muco é constituído principalmente de água (~90%) e secreções nasais contendo mucina (2%), íons (1%) e várias outras proteínas, tais como enzimas e imunoglobulinas (ARORA, SHARMA, GARG, 2002). As mucinas constituem uma classe de glicoproteínas em que a treonina e a serina são os principais aminoácidos da porção proteica, e a galactose, fucose, N-acetilglucosamina e ácido siálico constituem os resíduos que compõem a porção de açúcar. No pH da mucosa nasal (cerca de 5,5 a 6,5), a mucina apresenta-se carregada negativamente, devido à ionização dos grupamentos sulfatos e do ácido siálico da sua porção sacarídica. Neste caso, a presença do muco na cavidade nasal possibilita a utilização de sistemas de liberação mucoadesivos por esta via, aumentando o tempo de permanência da forma farmacêutica no local de absorção. Ainda, a carga negativa da mucina permite a interação de sistemas de liberação carregados positivamente, por meio interações eletrostáticas com a camada de muco.

Dentro deste contexto, o presente trabalho de doutorado traz como proposição o desenvolvimento e avaliação biofarmacêutica de sistemas de liberação nanoestruturados mucoadesivos contendo ácido eláico para administração nasal, com vistas a potencial utilização no tratamento do Alzheimer. Entre estes sistemas destacam-se as nanoemulsões, as quais são sistemas emulsionados transparentes ou translúcidos, cineticamente estáveis, apresentando diâmetro médio entre 50 e 200 nm. Tais sistemas apresentam inúmeras vantagens para a administração de fármacos, incluindo a capacidade de proteger as moléculas ativas contra degradação em meio fisiológico, liberar controladamente a substância ativa no sítio de ação, além de permitir a administração de fármacos hidrofóbicos em sistemas dispersos aquosos. As nanoemulsões são capazes de incorporar grandes quantidades de fármacos hidrofóbicos e, devido ao elevado grau de dispersão do fármaco este se deposita uniformemente nos tecidos oferecendo uma elevada superfície de contato para absorção (BOUCHEMAL et al., 2004; ALMEIDA, TEIXEIRA, KOESTER, 2008). Em decorrência da carga negativa da mucina presente no muco que reveste a cavidade nasal, o uso de nanoemulsões catiônicas tem sido explorado como

estratégia para aumento do tempo de residência destes sistemas nas superfícies mucosas, favorecendo a absorção transmucosal de fármacos (LALLEMAND et al., 2012).

Sistemas de cristais líquidos também têm sido estudados visando a administração nasal. Cristais líquidos são descritos como estruturas nanométricas bi- ou tridimensionais, organizadas em fases que podem variar entre hexagonal, lamelar ou cúbica. São termodinamicamente estáveis, podendo ser estocados por longo períodos, sem que ocorra a separação de fases. Tais sistemas sofrem transição de fases em resposta a estímulos físicos e químicos, tornando-se altamente estruturados e viscosos. Devido a sua estrutura porosa e altamente uniforme, os cristais líquidos exibem propriedades que favorecem a solubilização de fármacos em compartimentos oleosos ou aquosos, podendo também ser desenhados para formar uma matriz rígida capaz de controlar a liberação de moléculas ativas. Em especial, sistemas de cristais líquidos constituídos por PPG-5-CETETH (surfactante não iônico), ácido oleico e água mostraram ser promissores para liberação de fármacos pela via nasal. Após administração, a diluição nos fluidos da cavidade nasal provoca a transformação destes sistemas em matrizes cristalinas rígidas capazes de interagir com o muco, aumentando o tempo de residência da formulação no local de absorção (CARVALHO et al., 2013).

A presente tese está organizada em quatro capítulos. O primeiro capítulo refere-se à revisão bibliográfica, onde são abordados aspectos da DA e do uso de compostos polifenólicos na DA, assim como a relação do efeito neuroprotetor com sua atividade antioxidante. Nesta revisão ainda são abordados aspectos relacionados aos sistemas estabilizados por tensoativos e à liberação de fármacos no SNC. O segundo capítulo relata o desenvolvimento de nanoemulsões catiônicas contendo ácido elágico, a avaliação das propriedades mucoadesivas e da atividade antioxidante das formulações, além do estudo de permeação e retenção deste composto em modelo de célula de difusão de Franz, usando a mucosa nasal suína como modelo de membrana. O terceiro capítulo descreve os ensaios realizados na avaliação da atividade farmacológica do ácido elágico livre e nanoemulsionado em modelos experimentais da doença de Alzheimer após administração das nanoemulsões por via nasal e oral. E, por fim, o quarto capítulo propõe a obtenção de cristais líquidos a partir de misturas de oleilamina/PPG-5-CETETH-20/água a partir da construção de um diagrama de fases

ternário e avaliação das propriedades mucoadesivas. Dependendo da proporção dos três componentes, tais sistemas se comportam como líquidos transparentes isotrópicos capazes de responder a estímulos externos, alterando suas propriedades reológicas, quando em contato com o muco na temperatura corporal.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo geral**

Desenvolver sistemas nanoestruturados mucoadesivos para a administração nasal do ácido elágico.

### **Objetivos específicos**

- Obter nanoemulsões catiônicas contendo ácido elágico por meio da técnica de emulsificação espontânea
- Avaliar as nanoemulsões obtidas quanto ao teor de fármaco, eficiência de encapsulação, tamanho de partícula, potencial zeta e morfologia
- Avaliar a atividade antioxidante *in vitro* do ácido elágico livre e nanoemulsionado
- Avaliar o perfil de permeação do ácido elágico livre e nanoemulsionado em célula de difusão tipo Franz
- Preparar e caracterizar sistemas nanoestruturados a partir de misturas ternárias de oleilamina/PPG-5-CETETH-20/água
- Investigar possíveis interações dos sistemas nanoestruturados com os componentes do muco
- Avaliar o potencial terapêutico do ácido elágico livre e nanoemulsionado em modelos comportamentais *in vivo* da doença de Alzheimer
- Determinar parâmetros bioquímicos e de biomarcadores de oxidação dos sistemas nanoemulsionados após administração nasal e oral em camundongos.

---

---

## **CAPÍTULO 1: REVISÃO DA LITERATURA**

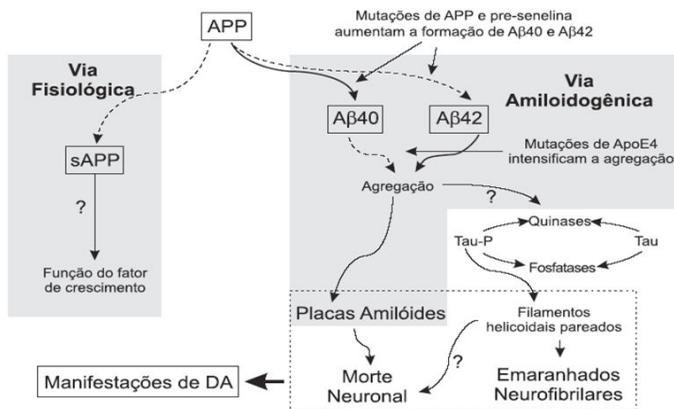
---

---

## 1.1 Doença de Alzheimer

A história da doença de Alzheimer (DA) teve seu início em 1901 quando o neurologista alemão Alois Alzheimer identificou os emaranhados fibrilares e placas dentríticas e as associou como a causa da doença e às manifestações clínicas, como desorientação, perda da memória, prejuízo cognitivo, afasia e apraxia, que vinham sendo apresentadas por uma paciente (GRAEBER et al., 1997). Desde estas primeiras descrições sobre a DA, muitos avanços foram feitos no sentido do entendimento dos distúrbios neuropatológicos envolvidos na doença. Atualmente, sabe-se que a DA, é caracterizada por perda de células neuronais e pelo acúmulo progressivo de filamentos helicoidais pareados, como emaranhados neurofibrilares, e de peptídeos amilóides em placas senis (GLENNER, 1983; WISNIEWSKI, WEGIEL, KOTULA, 1996). Os emaranhados neurofibrilares estão associados com a hiperfosforilação da proteína Tau. Esta proteína está envolvida na estabilização dos microtúbulos do citoesqueleto dos neurônios e é regulada através de sua fosforilação por várias proteínas quinases. Em pacientes com a DA a fosforilação da proteína Tau é de três a quatro vezes maior que o normal (KOPKE et al., 1993; GRUNDKE-IQBAL et al., 2006). A fosforilação anormal da proteína Tau leva à perda de sua função, com a desestruturação dos microtúbulos neuronais que se agregam em emaranhados neurofibrilares. As placas senis, por sua vez, são constituídas principalmente pelo peptídeo (A $\beta$ ), composto preferencialmente por 40 ou 42 aminoácidos e produzido pela clivagem da proteína precursora de amiloide (PPA) (HERZ, BEFFERT, 2000; BERTRAM, TANZI, 2008).

A PPA é uma proteína integral de membrana, presente em diversas células do organismo e é clivada por duas enzimas:  $\beta$ -secretase e  $\gamma$ -secretase. Esta clivagem gera o peptídeo. A alteração do processamento da proteína amiloide a partir de seu precursor é reconhecida como característica essencial na patogenia da DA (RANG, DALE, RITTER, 2001; BERTRAM, TANZI, 2008). A formação das placas senis e os emaranhados neurofibrilares são responsáveis pela perda sináptica e da função cognitiva. A neuropatologia da DA encontra-se sintetizada na Figura 1.1 (HERZ, BEFFERT, 2000).

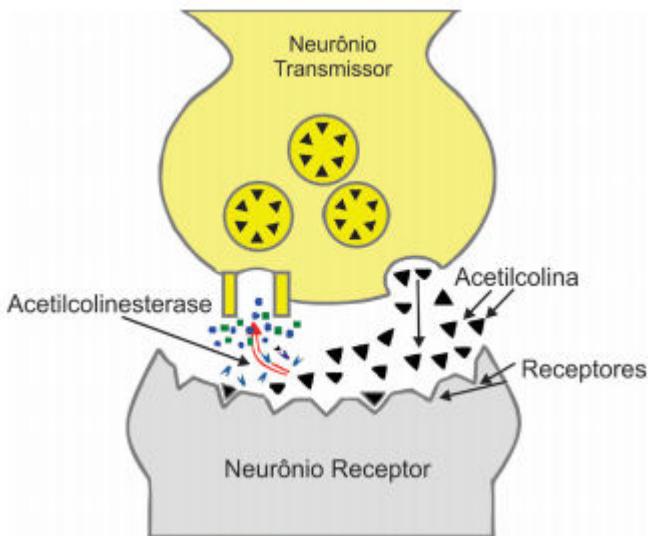


**Figura 1.1:** Processamento da proteína precursora de amilóide (APP), mostrando as vias fisiológica e amiloidogênica. As mutações na APP culminam na produção do peptídeo (A $\beta$ ) e sua agregação é favorecida pelas mutações na ApoE4, desencadeando a formação dos emaranhados neurofibrilares e placas senis.

Fonte: (RANG, DALE, RITTER, 2001).

A DA pode ser dividida em dois grupos com relação à idade do aparecimento dos sintomas e diagnóstico. A DA com início precoce afeta pessoas com menos de 60 anos, enquanto a de início tardio afeta pessoas com 60 anos de idade ou mais. A maioria dos casos de DA é esporádica (~ 90%), ao passo que apenas aproximadamente 10% são de origem genética. Os fatores genéticos tais como as mutações na APP (BROWN, 1991), presenilina 1 e presenilina 2 podem aumentar o metabolismo anormal de APP de tal forma a induzir a produção do peptídeo (A $\beta$ ) (HUTTON, HARDY, 1997). O gene da APP está localizado no cromossoma 21, enquanto as proteínas presenilina 1 e presenilina 2 têm seus genes mapeados nos cromossomas 14 e 1, respectivamente. O gene ApoE está localizado no braço longo do cromossomo 19, e possui três alelos principais, as ApoE  $\epsilon$ 2, ApoE  $\epsilon$ 3 e ApoE  $\epsilon$ 4, que codificam as isoformas de ApoE designadas por ApoE2, E3 e E4. Entretanto, a forma E4 tem sido associada ao maior risco de desenvolver a DA (HARDY, 1996; FARRER et al., 1997; MYERS, GOATE, 2001). Direta ou indiretamente, APP, presenilina 1, presenilina 2 e apo E4 contribuem para o aumento do estresse oxidativo, o que pode levar à patogênese da DA.

Alguns estudos também sugerem que a neurotransmissão colinérgica está envolvida na etiologia da DA (COYLE, PRICE, DELONG, 1983; KIMURA et al., 2005), principalmente com relação à atividade do neurotransmissor acetilcolina (ACh), que participa do processo de memória e aprendizagem. A ACh é sintetizada a partir da acetilação da colina com acetil-CoA, pela ação da colina acetiltransferase, e permanece armazenada em vesículas sinápticas. A acetilcolinesterase (AChE) que é responsável por captar a ACh, realiza uma forte modificação na estrutura molecular convertendo-o em colina que é reabsorvida para ser convertida em ACh, novamente, permitindo assim, a reutilização do neurotransmissor. O ciclo da síntese, armazenamento e liberação da ACh estão representados na Figura 1.2. Os efeitos específicos da ACh em determinada sinapse colinérgica são determinados, em grande parte, pelo tipo de receptor de ACh presente nessa sinapse. Os receptores colinérgicos são divididos em duas grandes classes: os receptores colinérgicos muscarínicos e colinérgicos nicotínicos (BRUNTON, LAZO, PARKER, 2007; GOLAN, CAIRO, SIMON, 2009).



**Figura 1.2:** Liberação e captação da acetilcolina (ACh) nas sinapses nervosas.

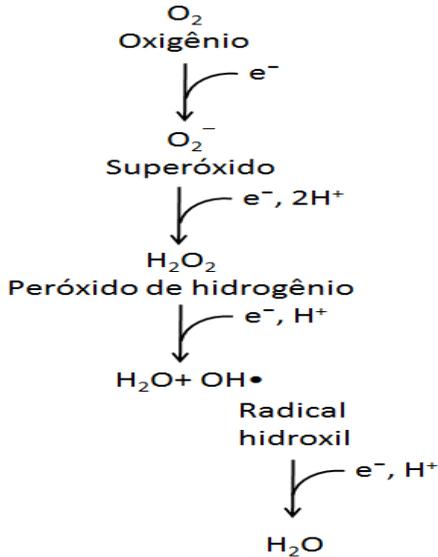
Fonte: Petronilho, Pinto, Villar (2013).

Na DA, a concentração da ACh está diminuída. Esta disfunção colinérgica em doenças neurodegenerativas pode ser resultante da redução na síntese da ACh, em decorrência da redução da colina acetiltransferase, da captação de colina, de anormalidades neuronais e axonais colinérgicas, e da degeneração de neurônios colinérgicos (FISHER, 2008). Igualmente, na DA há perda de neurônios colinérgicos e a atividade da acetilcolinesterase (AChE) está aumentada. Estes déficits colinérgicos podem contribuir para os sintomas cognitivos e comportamentais da DA, os quais variam afetando pessoas diferentes de formas diferentes, mas geralmente iniciando com a dificuldade em lembrar informações recentes (CHAUHAN, CHAUHAN, 2006). Após, os indivíduos experimentam outros problemas, como perda de memória, que perturba a rotina diária; incapacidade de planejamento ou de resolução de problemas; dificuldade em completar tarefas simples em casa, no trabalho, ou no lazer; confusão com o tempo ou lugar; dificuldade para entender as imagens visuais e relações espaciais; diminuição ou falta de bom senso; e alterações de humor e personalidade (MASLOW, 2010).

### **1.1.1 Estresse oxidativo e a doença de Alzheimer**

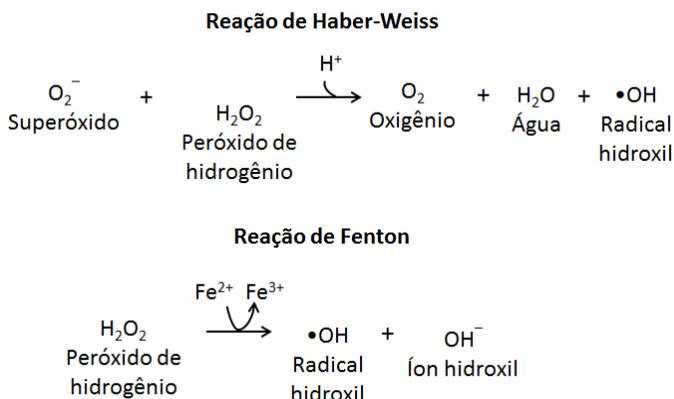
O oxigênio é essencial à vida humana pois é necessário para as reações de oxidação no processo de geração de energia intracelular. Em condições fisiológicas do metabolismo celular aeróbio, o  $O_2$  sofre redução tetravalente, com aceitação de quatro elétrons, resultando na formação de água. Durante esse processo são formados intermediários reativos, denominados espécies reativas de oxigênio (EROs), como os radicais superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), hidroperoxila ( $HO_2\cdot$ ) e hidroxila ( $OH\cdot$ ), e o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) (Figura 1.3). Desses intermediários na redução de  $O_2$  à água, o radical hidroxila é, sem dúvida, o radical livre mais danoso, uma vez que está envolvido em reações como a peroxidação de lipídeos e geração de outros radicais tóxicos. O ânion superóxido também é bastante reativo, mas possui solubilidade limitada em lipídeos e não pode se difundir através das membranas. Entretanto, ele pode gerar o radical hidroxil, mais reativo, por reagir não-enzimaticamente com o peróxido de hidrogênio, na presença de ferro e/ou cobre, através da reação de Fenton (Figura 1.4). Estes radicais e o peróxido de hidrogênio são formados rotineiramente nas células, durante

a redução do oxigênio na mitocôndria e, em condições normais, a reatividade dos mesmos é neutralizada com a entrada dos quatro elétrons. Entretanto, quando há geração excessiva de espécies reativas de oxigênio (EROs) e/ou diminuição de antioxidantes endógenos, ocorre o estresse oxidativo, o qual pode ser definido como o desequilíbrio entre a formação e remoção de agentes oxidantes no organismo (DEVLIN, MICHELACCI, 2002; SMITH, MARKS, LIEBERMANN, 2007).



**Figura 1.3:** Redução tetravalente do oxigênio molecular ( $\text{O}_2$ ) na mitocôndria até a formação de água ( $\text{H}_2\text{O}$ ), resultando na formação de espécies reativas de oxigênio superóxido, peróxido de hidrogênio e o radical hidroxila.

Fonte: Adaptado de Devlin; Michelacci (2002).



**Figura 1.4:** Etapas de um elétron na redução do oxigênio, levando à formação das espécies reativas de oxigênio superóxido, peróxido de hidrogênio e o radical hidroxila.

Fonte: Adaptado de Devlin; Michelacci (2002).

Radicais livres também podem ser produzidos de fontes exógenas, como a luz ultravioleta (UV), principalmente nos comprimentos de onda maiores que 280 nm (UVA e UVB), radiação ionizante e agentes químicos (MCDANIEL et al., 2005). Ainda, EROs são produzidas durante processos patológicos, como, por exemplo, o que ocorre em uma resposta inflamatória celular (BERRA, MENCK, DI MASCIO, 2006). Como consequência, o estresse oxidativo pode desencadear doenças graves como Alzheimer, diabetes e até mesmo o câncer, conforme mostrado na Tabela 1.1 (RATNAM et al., 2006; SMITH, MARKS, LIEBERMANN, 2007). A fim de tornar seus elétrons pareados, os radicais livres podem obter elétrons a partir de outras moléculas. Assim, eles reagem com lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos, causando danos às funções celulares. Geralmente, o dano oxidativo resulta em alterações nos componentes celulares e nas propriedades da membrana, tais como a fluidez, transporte de íons, a atividade das enzimas e proteínas, podendo resultar na morte celular.

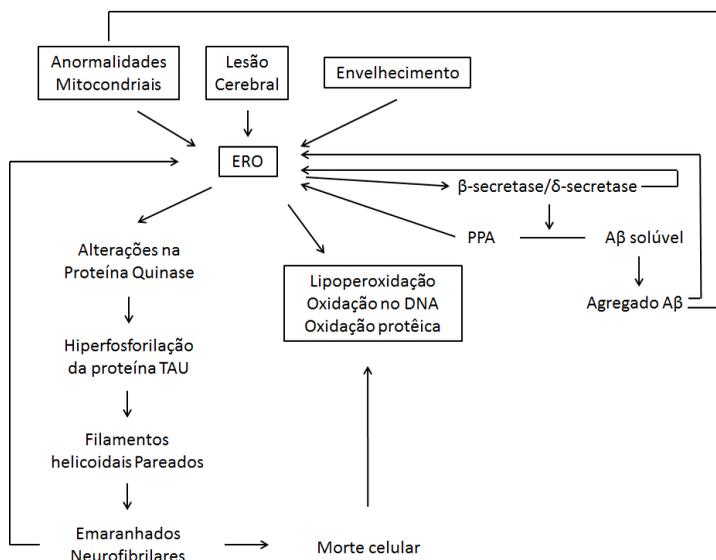
**Tabela 1.1:** Papel das EROs em várias doenças.

<b>Patologias</b>	<b>Papel dos radicais livres na fisiopatologia de doenças</b>
Aterosclerose	Disfunção endotelial mediada por superóxido, ativação de macrófagos.
Infarte do Miocárdio	Culmina com injúria isquêmica por reperfusão e necrose e/ou apoptose de miócitos
Hipertensão	Proliferação de células do músculo liso vascular mediada por ERO, oxidação via NADH/NADPH oxidase e disfunção endotelial
Diabetes	Aceleram a formação de produtos finais de glicosilação avançada; disfunção endotelial mediada por superóxido
Envelhecimento	Dano celular e anormalidades metabólicas
Câncer	Causam mutações genéticas (modificações nas bases piridina e purina) e modificações pós-transducionais levando à interrupção de processos celulares
Doença de Parkinson	Intermedeiam disfunções mitocondriais
Doença de Alzheimer	Formação de produtos finais de glicosilação avançada e peptídeos amilóides; intermedeiam a neurotoxicidade das células do hipocampo e de membranas sinaptossomais

Fonte: RATNAM et al. (2006).

A investigação de situações de estresse oxidativo no sistema nervoso central (SNC) é primordial para compreender como espécies oxidativas contribuem para a patologia de doenças neurodegenerativas (BANDOPADHYAY, DIPAK, BANERJEE, 1999). Inúmeras pesquisas experimentais envolvendo modelos animais e de cérebro humano sugerem que o estresse oxidativo desempenha um papel importante na degeneração neuronal na DA (KIM et al., 2003; CUTLER et al., 2004; JHOO et al., 2004; PARK et al., 2004). A agregação do peptídeo (A $\beta$ ), a formação de emaranhados neurofibrilares, placas senis, anormalidades mitocondriais e o envelhecimento são fatores que contribuem para o aumento do estresse oxidativo na DA. Vários estudos sugerem que EROs estão envolvidas na agregação do peptídeo (A $\beta$ ), na formação de emaranhados neurofibrilares, e no acúmulo de placas senis na DA. Há evidências também que a geração de EROs aumente a

neuropatologia envolvida, criando assim um ciclo vicioso de geração de EROs que excede em muito o sistema de defesa antioxidante fisiológico (Figura 1.6) (CHAUHAN, CHAUHAN, 2006).

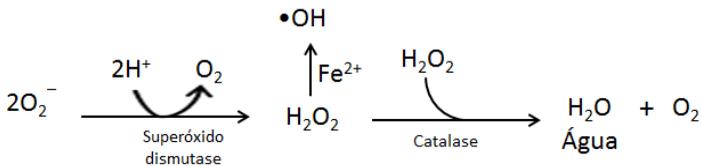


**Figura 1.6:** Possível envolvimento do envelhecimento, de anormalidades mitocondriais, lesão cerebral, da PPA (proteína precursora de amiloide), e de filamentos helicoidais pareados na morte celular induzida por estresse oxidativo na DA. As EROs podem ativar as  $\beta$ -secretase e  $\delta$ -secretase, aumentando a produção de agregados a partir do PPA, que diretamente induz a produção de EROs. Os agregados também podem induzir as alterações mitocondriais, que aumentam ainda mais a produção de EROs. Estas EROs reagem com lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos, levando à morte celular na DA. EROs também podem ativar proteínas quinases, levando à fosforilação da Tau e à formação dos emaranhados neurofibrilares, o que produz mais EROs, resultando em morte celular.

Fonte: Adaptado de Chauhan, Chauhan (2006).

### 1.1.2 Mecanismos de defesa antioxidante e biomarcadores de oxidação na doença de Alzheimer

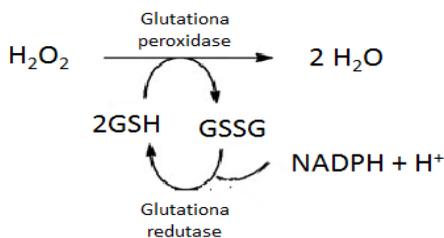
Estima-se que de 3-5 % do oxigênio consumido sejam convertidos em EROs, podendo causar danos celulares irreparáveis. Portanto, as células que vivem em ambiente aeróbico desenvolveram inúmeros mecanismos para remover EROs e, assim, se proteger contra os efeitos deletérios destes radicais. Entre eles, a enzima superóxido dismutase (SOD) catalisa a conversão de superóxido em peróxido de hidrogênio (Figura 1.7). Os mamíferos possuem três isoenzimas diferentes da SOD; a forma que contém cobre e zinco no seu sítio ativo e está presente no citosol (SOD1), a mitocondrial que contém manganês no seu sítio ativo (SOD2), e a extracelular (SOD3). Estas diferentes formas da mesma enzima atuam em locais específicos da célula, denotando a importância da remoção do ânion superóxido das mesmas. Além da SOD, outras enzimas são capazes de proteger as células do dano oxidativo. A catalase (CAT) é capaz de reduzir o peróxido de hidrogênio formado pelo radical hidroxil nas reações de Fenton e Haber-Weiss em água e oxigênio (Figura 1.8). A CAT é encontrada principalmente nos peroxissomos e, em menor quantidade, no citosol e na fração microsomal da célula. As maiores atividades são encontradas nos tecidos com grande quantidade de peroxissomas, como o rim e o fígado (ACHARYA et al., 1991; DEVLIN, MICHELACCI, 2002; SMITH, MARKS, LIEBERMANN, 2007; BIRBEN, SAHINER, KALAYCI, 2012).



**Figura 1.7:** A enzima superóxido dismutase converte o íon superóxido em peróxido de hidrogênio e a enzima catalase, por sua vez, transforma o peróxido de hidrogênio em água e oxigênio, protegendo as células do dano oxidativo.

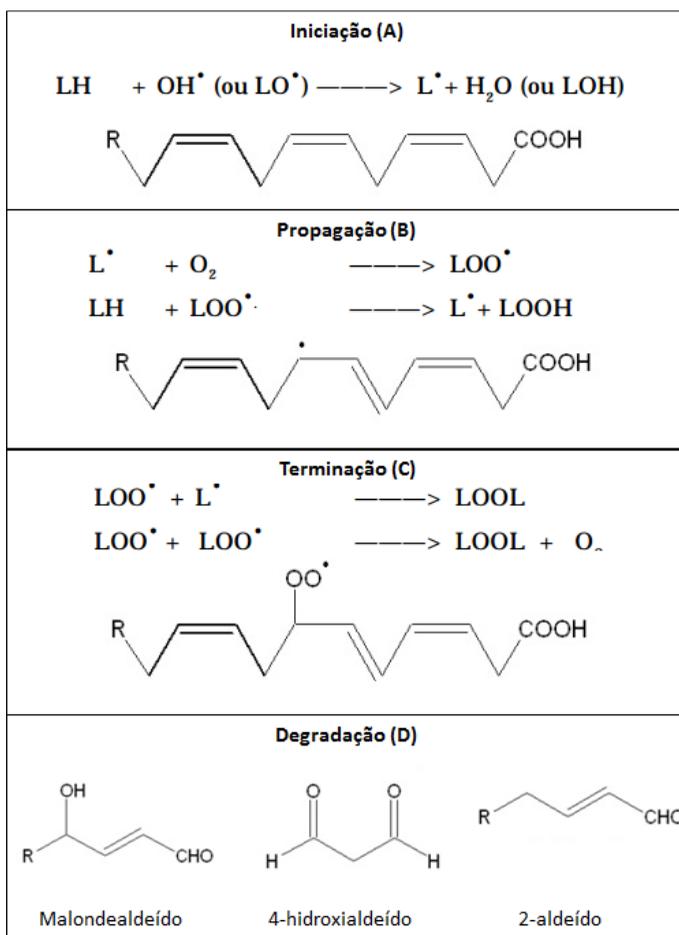
Fonte: Adaptado de Devlin, Michelacci (2002).

A glutatona (GSH) é um outro importante sistema de proteção endógena das células contra os prejuízos provocados pelas EROs. Este composto é um tripeptídeo constituído por glutamato, cisteína e glicina, com o grupamento amino da cisteína unido por uma ligação peptídica ao grupo  $\gamma$ -carboxila do glutamato. Os grupos sulfidríla reativos da glutatona reduzem o peróxido de hidrogênio à água e os peróxidos lipídicos à álcoois não tóxicos, em reações catalisadas pela glutatona-peroxidase (GPx). Nessas reações, duas moléculas de glutatona são oxidadas para formar uma única molécula de glutatona-dissulfeto (GSSG). A GPx constitui um grupo de enzimas contendo selênio na forma de selenocisteína em seu sítio ativo, com algumas diferenças em suas propriedades e na distribuição tecidual. Nas células são encontradas principalmente no citosol e nas mitocôndrias e são a principal forma de remover o peróxido de hidrogênio produzido nos peroxissomas. Uma vez formada, a glutatona oxidada (GSSG) deve ser reduzida à forma sulfidríla pela glutatona-redutase (GR) em um ciclo redox, sendo esta etapa considerada essencial para manter íntegro o sistema de proteção celular (Figura 1.8) (SMITH, MARKS, LIEBERMANN, 2007; BIRBEN, SAHINER, KALAYCI, 2012). A GR é uma flavoproteína dependente de NADPH e flavina adenina dinucleótido, que catalisa a conversão de glutatona oxidada (GSSG) à GSH. Como a principal fonte de NADPH provém da via das pentoses, a proteção contra o dano oxidativo depende muito desta via (DEVLIN, MICHELACCI, 2002; SMITH, MARKS, LIEBERMANN, 2007).



**Figura 1.8:** A glutatona-peroxidase reduz o peróxido de hidrogênio a água e a glutatona redutase regenera a glutatona reduzida.  
Fonte: Adaptado de Devlin, Michelacci (2002).

A peroxidação lipídica pode ocorrer quando todas as defesas antioxidantes biológicas falham em proteger moléculas frente ao ataque das EROs. Isto ocorre pela propriedade que os radicais livres têm de reagir com ácido graxos poli-insaturados, servindo como iniciadores da reação (Figura 1.9). A reação em cadeia é propagada quando o  $O_2$  é adicionado para formar radicais peroxil lipídicos e peróxidos lipídicos. Por fim, a degradação lipídica ocorre, formando produtos como o malondialdeído (a partir de ácidos graxos com três ou mais ligações duplas), e etano e pentano (a partir da degradação peroxidativa de ácidos graxos omega-3 e ômega-6, respectivamente) (SMITH, MARKS, LIEBERMANN, 2007; MIMICA-DUKIĆ et al., 2013).



**Figura 1.9:** Reação de lipoperoxidação em cadeia realizada por radicais livres. (A) Etapa de iniciação por um radical hidroxil ou outro radical que retira um átomo de hidrogênio de um lipídeo poli-insaturado (LH), com a formação de um radical lipídico ( $L^\bullet$ ); (B) etapa de propagação pela reação com  $O_2$ , com formação de um radical peróxi lipídico ( $LOO^\bullet$ ) e um peróxido lipídico (LOOH); (C) etapa de terminação da lipoperoxidação; (D) formação do malondealdeído, 4-hidroialdeído e 2-aldeído.

Fonte: Adaptado de Smith, Marks e Liebermann (2007); Mimica-Dukić e colaboradores (2013).

A peroxidação lipídica invariavelmente altera ou danifica a estrutura lipídica da membrana celular, sendo uma das mais atingidas em decorrência da oxidação. O arranjo coeso da bicamada lipídica e organização estrutural são destruídos, o que acarreta alterações na permeabilidade celular, resultando na perda da seletividade iônica e liberação do conteúdo das organelas, como as enzimas hidrolíticas e lisossomas, e formação de produtos citotóxicos (como o malonaldeído), culminando com a morte celular (HERSHKO, 1989; SMITH, MARKS, LIEBERMANN, 2007).

O ensaio de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) é usado para avaliar os produtos da peroxidação lipídica, incluindo hidroperoxídeos lipídicos e aldeídos, os quais estão em concentrações aumentadas em resposta ao estresse oxidativo. Os valores obtidos no ensaio de TBARS são usualmente expressados em equivalentes de malonaldeído, que funciona como um biomarcador não específico da peroxidação lipídica (BUTTERFIELD et al., 2001). Níveis aumentados de malondialdeído foram encontrados em cérebros de humanos portadores da doença de Alzheimer, mas a resposta celular tem sido diferente entre as regiões do cérebro. Subbarao e colaboradores (1990) obtiveram valores maiores de TBARS no lobo frontal, mas não no cerebelo de pacientes com DA, em comparação com o grupo controle. O aumento significativo de TBARS no córtex motor, sensorial e occipital em um pequeno número de pacientes com a DA foi mostrado por (BALAZS, LEON, 1994).

Jhoo e colaboradores (2004) avaliaram o estresse oxidativo induzido pela administração intracerebroventricular do peptídeo  $\beta$ -amilóide (A $\beta$ 1-42) em camundongos. Os autores verificaram um aumento significativo na atividade da SOD (superóxido dismutase) cobre citosólica e na SOD manganês mitocondrial no hipocampo e no córtex cerebral dos animais infundidos com A $\beta$ 1-42. A atividade da glutatona redutase (GR) só foi aumentada 2 h após a administração da A $\beta$ 1-42. Houve ainda a produção de malondialdeído e carbonilação de proteínas (oxidação de proteínas), que permaneceram elevadas durante os 10 dias do experimento. Os autores também mostraram que administração do antioxidante  $\alpha$ -tocoferol previne significativamente estes efeitos oxidativos.

Lovell e colaboradores (1995) determinaram os níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), como medida da peroxidação lipídica, e a atividade de enzimas antioxidantes, como a

superóxido dismutase (SOD), glutaciona peroxidase (GPx), glutaciona redutase (GR) e a catalase (CAT), em nove regiões diferentes do cérebro de treze pacientes com a DA. Os níveis de TBARS se mostraram elevados em sete das regiões do cérebro dos portadores da DA, em comparação com os controles equiparados pela idade. Níveis elevados da GPx, GR e CAT foram encontrados em algumas das regiões cerebrais, enquanto os níveis de SOD mostraram-se aumentados em todas as regiões avaliadas. Assim, os autores evidenciaram a ocorrência de estresse oxidativo no cérebro de pessoas com a DA.

### **1.1.3 Prevalência e tratamento da DA**

A DA é a causa mais comum de demência em idosos, aumentando sua prevalência exponencialmente entre 65 e 95 anos. A doença acomete cerca de 5% da população entre 65 e 69 anos, 15 a 20% após os 80 anos e 40 a 50% acima de 95 anos. A DA predomina em mulheres de idade mais avançada, tem distribuição universal e é uma das principais causas de doença no idoso, constituindo um dos maiores problemas médicos e sociais na atualidade (FILHO, 2011). Portanto, é a doença neurodegenerativa mais frequente e a causa mais comum de demência associada ao envelhecimento, sendo estimado que atualmente existam 36 milhões de pessoas acometidas com a doença no mundo. Somente nos EUA, os custos relacionados a esta patologia atingem o montante de US\$ 200 bilhões anualmente; estes valores se referem aos gastos médicos diretos e à perda da produtividade (Alzheimer's Association, 2013).

No Brasil, ao longo dos últimos anos houve crescimento no número de idosos. Os idosos brasileiros somam 23,5 milhões de pessoas. Apesar de este processo denotar grande avanço na qualidade de vida da população, também é considerado um grande desafio, pois esta faixa etária é acometida por inúmeras doenças e acarretam gastos exorbitantes aos cofres públicos (IBGE, 2012). Além da idade, já se sabe que outros grupos apresentam predisposição para a DA, incluindo aqueles com histórico de demência, que é causada por várias doenças que resultam da perda de células neuronais provocando perda ou diminuição da memória e de outras habilidades cognitivas, traumas cranianos, síndrome de Down, baixa escolaridade, depressão, diabetes

mellitus, tabagismo, alcoolismo, sedentarismo, dentre outros (HARRINGTON, 2001; BERTRAM, TANZI, 2008; MASLOW, 2010).

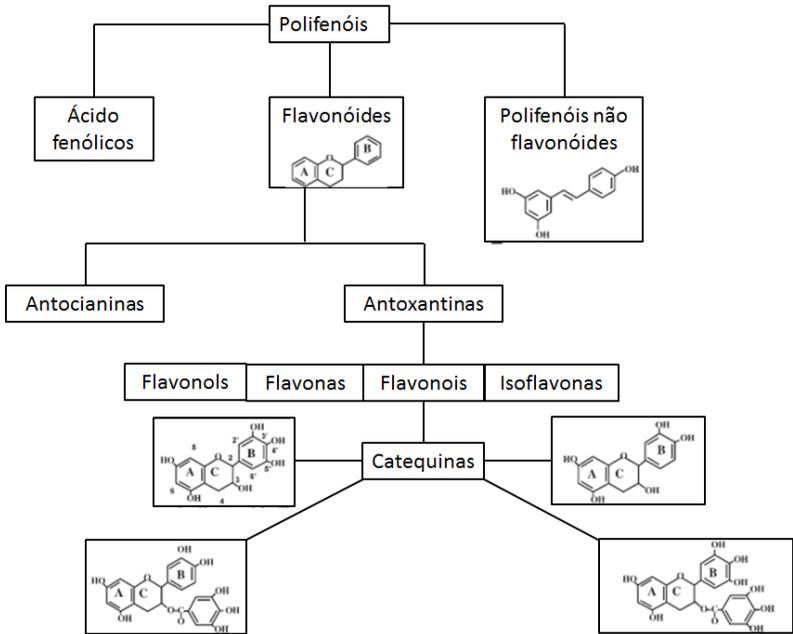
Apesar dos valores gastos com a doença, da incidência cada vez maior, do entendimento fisiopatológico e dos inúmeros estudos científicos relacionados à DA, pouco se evoluiu no modo de tratamento da doença (MASLOW, 2010). A doença de Alzheimer não tem cura, e o principal objetivo das medicações utilizadas atualmente se limita a minimizar os sintomas e a progressão da enfermidade (BARAK, AIZENBERG, 2010). Dentre os tratamentos utilizados estão as intervenções psicossociais e as estratégias farmacológicas, que atuam apenas na fenda sináptica. O objetivo do tratamento medicamentoso é propiciar a estabilização do comprometimento cognitivo, do comportamento e da realização das atividades da vida, com um mínimo de efeitos adversos. Duas classes de fármacos são atualmente empregadas no tratamento da DA: os inibidores da enzima acetilcolinesterase, como o donepezil e a rivastigmina, que atuam mantendo os níveis do neurotransmissor acetilcolina no cérebro, e os antagonistas dos receptores de glutamato (N-metil-D-aspartato, NMDA), como a memantina, que atuam diminuindo a recaptção do glutamato (BRINKS apud TAYEB et al., 2009; REISBERG et al., 2003; SHAH et al., 2008). Entretanto, estas terapias não são capazes de bloquear a progressão do processo neurodegenerativo, que com o aparecimento dos primeiros sintomas, já está bastante avançado. Portanto, a busca por terapias que possam estagnar ou bloquear o avanço da doença e do declínio cognitivo tem sido o objetivo de diversos estudos científicos. Visto que o estresse oxidativo tem mostrado desempenhar um papel importante na patogênese da DA, uma abordagem terapêutica utilizando compostos capazes de proteger esses danos oxidativos poderia ser útil no seu tratamento (CHAUHAN, CHAUHAN, 2006).

## 1.2 Polifenóis

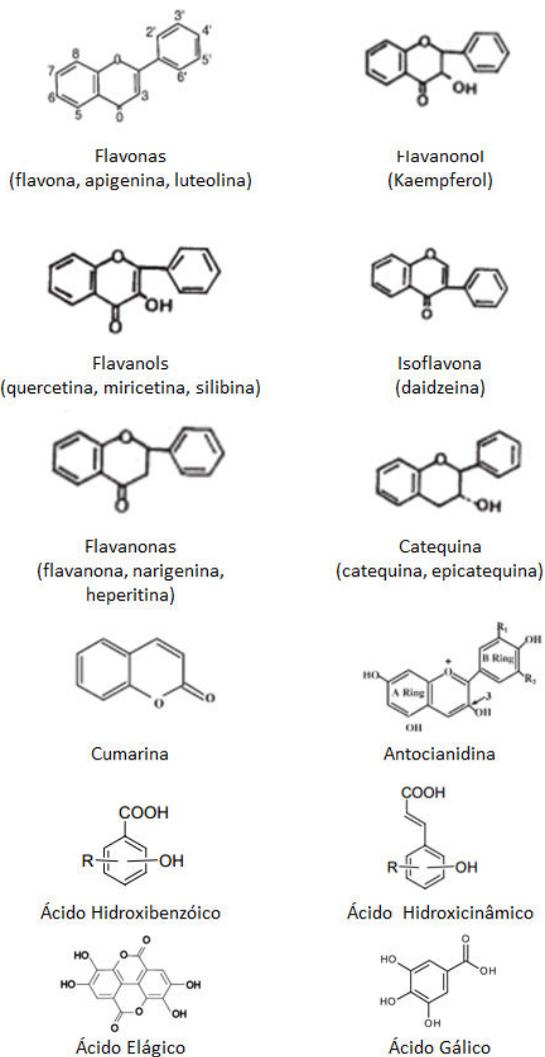
Polifenóis são compostos químicos mais comumente encontrados em bebidas e alimentos à base de plantas consumidas em todo o mundo (JOSEPH et al., 2007). Eles constituem um grande grupo fitoquímico com mais de 8000 compostos identificados. Os polifenóis podem ser divididos em várias classes com base na sua estrutura, as

quais são simples ou complexas, mas possuindo pelo menos um anel aromático, em que ao menos um hidrogênio é substituído por um grupamento hidroxila. Dentre eles, destacam-se como antioxidantes fenólicos mais comuns de fonte natural: os flavonóides, os ácidos fenólicos, e os taninos (Figura 1.10 e Figura 1.11). A principal função destes compostos nas plantas é a proteção contra espécies reativas de oxigênio (ERO<sub>s</sub>), produzidos durante a fotossíntese (RAMOS, 2007).

Dentre os compostos fenólicos largamente distribuídos na natureza destacam-se os ácidos fenólicos, que se caracterizam por apresentar um anel benzênico, um grupamento carboxílico e um ou mais grupamentos de hidroxila e/ou metoxila na molécula. Duas classes de ácidos fenólicos podem ser distinguidas, dependendo da sua estrutura: os derivados do ácido benzoico que possuem sete átomos de carbono (C6-C1) e são os ácidos fenólicos mais simples encontrados na natureza, e os derivados do ácido cinâmico, que possuem nove átomos de carbono (C6-C3) (KHADEM, MARLES, 2010). Das classes de compostos fenólicos derivados estruturais do ácido benzoico (C6-C1), o ácido gálico é o que encontrado com mais frequência na natureza, assim como seu dímero de condensação, o ácido elágico. Os ácidos gálico e elágico são constituintes dos taninos hidrolisáveis, do qual são liberados por hidrólise ácida (SIMÕES et al., 2007).



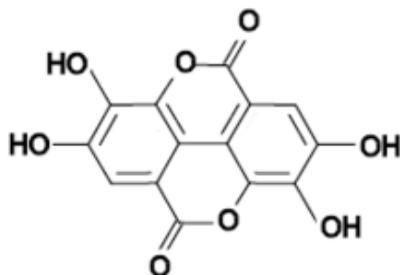
**Figura 1.10:** Classificação e estrutura de alguns polifenóis naturais.  
 Fonte: Adaptado de Ramassamy (2006).



**Figura 1.11:** Principais classes de polifenóis e compostos relacionados.  
Fonte: Adaptado de Ramassamy (2006); Khadem e Marles (2010).

### 1.2.1 Ácido Elágico

O ácido elágico (AE), um derivado dimérico do ácido gálico, é um composto fenólico encontrado em frutas como o morango, romã, framboesa, amora, dentre outras (PRIYADARSINI et al., 2002). Estruturalmente, o AE é uma molécula termodinamicamente estável com quatro anéis que representam a porção lipofílica e quatro grupamentos fenólicos e dois lactônicos (os quais podem atuar como doador e receptor de prótons, respectivamente) que representam a parte hidrofílica (Figura 1.12) (BALA et al., 2006). Trata-se de um pó levemente amarelado, com ponto de fusão maior que 360 °C, e massa molar de 302,20 (fórmula molecular: C<sub>14</sub>H<sub>6</sub>O<sub>8</sub>). É insolúvel em água e ligeiramente solúvel em metanol e etanol (PubChem Compound 2013).



**Figura 1.12:** Estrutura química do ácido elágico (2,3,7,8-tetrahidroxi[1]benzopirano[5,4,3-cde][1]benzopiran-5,10-diona).

Fonte: Bala et al (2006).

O AE tem demonstrado inúmeros efeitos farmacológicos, tais como anticarcinogênico (ZHANG et al., 1993), antimutagênico (KAUR, GROVER, KUMAR, 1997), antioxidante (COZZI et al., 1995), e anti-inflamatório (ROGERIO et al., 2006). Sua eficiência antioxidante está relacionada com a presença de grupamentos hidroxilas, os quais são responsáveis pela capacidade de doar um átomo de hidrogênio e estabilizar elétrons desemparelhados (NICOLI, ANESE, PARPINEL, 1999). Entretanto, apesar dos inúmeros efeitos farmacológicos descritos para o ácido elágico, este composto apresenta baixa biodisponibilidade

por via oral, a qual é atribuída a sua baixa solubilidade aquosa, elevado metabolismo no trato gastrointestinal e de primeira passagem e ligação irreversível ao ADN e proteínas celulares (WHITLEY et al., 2003). O AE tem sido classificado no Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB) como substância da classe IV, ou seja, com baixa solubilidade (< 10 mg/mL em tampão fosfato, pH 7,4) e baixa permeabilidade ( $0,13 \times 10^{-6}$ ) (AMIDON et al. apud MURUGAN et al., 2009).

Estudos farmacocinéticos apontaram que apenas 10% da dose de AE administrada por via oral em ratos é excretada na urina e fezes, na forma do metabólito 3,8-dihidroxi-6H-dibenzo[b,d]piran-6-one (DOYLE, GRIFFITHS, 1980). Estudos de absorção, distribuição e eliminação do ácido elágico marcado radioativamente ( $^3\text{H}$ -AE), após administração oral em camundongos, foram realizados por Teel e Martin (1988). O pico de concentração do  $^3\text{H}$ -AE no sangue ocorreu 30 minutos após administração, enquanto na bile e urina a concentração máxima foi alcançada após 120 minutos. Os níveis de concentração no sangue, tecidos e bile foram baixos e quase toda a dose absorvida foi excretada pela urina. Análises de CLAE indicaram a presença de quatro metabólitos do ácido elágico na urina, dois no sangue e um na bile. Entretanto, mais de 53% da dose administrada oralmente permaneceu no TGI após 24 horas, dos quais 80% eram de AE livre (não alterado). Teel (1987) administrou o  $^3\text{H}$ -AE pela via intraperitoneal e o pico de concentração na bile foi obtido após 60 minutos e na urina após 120 minutos. Três metabólitos foram encontrados na urina e um na bile e, dos órgãos avaliados, o rim e o fígado apresentaram as maiores concentrações, enquanto a menor concentração foi detectada no cérebro, indicando que o AE é semi-impermeável à barreira hematoencefálica. Estudos *in vivo* também foram realizados por Seeram, Lee e Heber (2004), mas após a administração de 180 mL de suco de romã contendo 25 mg de AE a voluntários. Neste estudo, a concentração máxima (31,9 ng/mL) de AE foi detectada no plasma humano 1 hora após administração, sendo eliminado em 4 horas.

Durante décadas, a maioria dos estudos envolvendo polifenóis (como o ácido elágico) foi concentrada nas propriedades antioxidantes destes compostos (HALLIWELL, 2001). Atualmente, os polifenóis têm ganhado destaque pelos seus efeitos contra o envelhecimento e doenças neurodegenerativas (KAY, 2010). Yang e colaboradores (2008) avaliaram a atividade antioxidante do AE em cultura de astrócitos co-incubada com íons cádmio, como agente gerador de estresse oxidativo.

Em cultura de astrócitos, o aumento da geração de EROs causa morte celular, pois estes interferem na homeostase do cálcio. O tratamento dos astrócitos com AE levou à inibição da geração de EROs e da morte celular avaliada pelo ensaio do MTT.

Feng e colaboradores (2009) avaliaram o efeito do AE sobre a agregação da A $\beta$ 42 e neurotoxicidade *in vitro* em cultura de células de neuroblastoma SH-SY5Y. Os autores verificaram que o EA promove a formação de fibrilas de Abeta com significativa redução de oligômeros. A redução da neurotoxicidade induzida pela A $\beta$ 42 sobre as células SH-SY5Y foi verificada pelo ensaio do MTT, o que deu suporte a hipótese de que a formação de placas representa um mecanismo de proteção, em que o organismo sequestra agregados de Abeta tornando-as inócuas.

Hartman e colaboradores (2006) administraram o suco de romã contendo certa quantidade de ácido elágico (115 ppm) à camundongos transgênicos (APP<sup>sw</sup>/Tg2576), que expressavam uma forma de proteína precursora de amiloide (APP) que causa DA familiar. Os camundongos tratados com o suco de romã aprenderam tarefas no labirinto aquático e nadaram com mais rapidez, quando se comparados ao grupo controle. Os animais tratados com suco de romã também exibiram redução de aproximadamente 50% no acúmulo de  $\beta$ -amilóide solúvel e deposição de amilóide no hipocampo, em comparação com os camundongos do grupo controle. Com base nos resultados os autores concluíram que compostos presentes no suco de romã podem ser úteis no tratamento da DA.

Murugan e colaboradores (2009) avaliaram a biodisponibilidade oral e atividade antioxidante de uma formulação contendo AE em um complexo fosfolipídico (equivalente a 25 e 50 mg/kg) em camundongos. Os autores avaliaram o dano hepático induzido pelo tetracloreto de carbono e verificaram que o complexo fosfolipídico/AE foi capaz de proteger o fígado, restaurando a atividade das enzimas SOD, CAT e glutathiona e de TBARS, quando comparado com o grupo controle. A concentração sérica de AE obtida a partir do complexo foi maior (C<sub>max</sub> = 0,54  $\mu$ g/mL) do que a do AE livre (C<sub>max</sub> = 0,21  $\mu$ g/mL), quando a dose de 80 mg/kg foi administrada, e o complexo manteve a concentração plasmática efetiva por um período maior de tempo. Os resultados experimentais evidenciaram a maior atividade hepatoprotetora do AE na formulação lipídica, em decorrência da sua atividade antioxidante, quando comparada com o AE livre administrado na mesma dose.

Sonaje e colaboradores (2007) encapsularam o AE em nanopartículas de ácido polilático-co-glicólico (PLGA) e policaprolactona (PCL), buscando melhorar a biodisponibilidade deste polifenol pela via oral. As nanopartículas foram preparadas pelo método de emulsificação e difusão do solvente, utilizando o brometo de didodecildimetil amônio (DMAB) e álcool polivinílico (PVA) como estabilizantes. A absorção intestinal do AE foi avaliada em ensaios de permeação *in situ* em ratos, e os resultados mostraram que a captura intestinal do AE foi significativamente maior com a administração das nanopartículas estabilizadas com DMAB, do que com administração de uma suspensão de AE em carboximetilcelulose e de partículas estabilizadas pelo PVA contendo AE. As nanopartículas de AE foram capazes de evitar a nefrotoxicidade induzida pela ciclosporina numa dose três vezes menor, sugerindo melhora na biodisponibilidade oral deste polifenol.

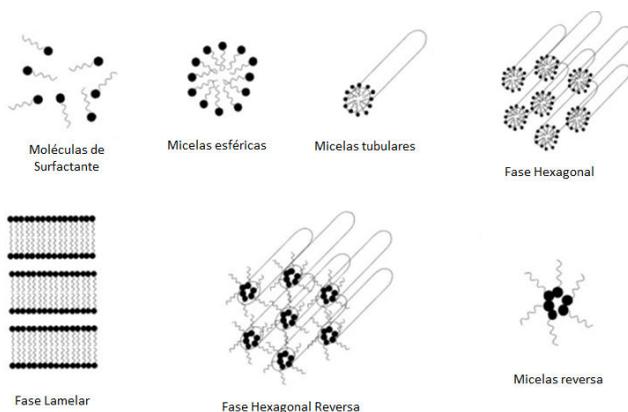
Wilson, Mickley e Matera (2010) avaliaram os possíveis benefícios da administração do ácido elágico em restaurar a memória espacial e de referência, por meio da redução da extensão da peroxidação lipídica causada por EROs, em animais infundidos intracerebralmente como uma mistura de A $\beta$  (1-40) e A $\beta$  (1-42). Os autores mostraram que os animais do grupo controle infundidos com a A $\beta$  tiveram a memória espacial e de referência prejudicada, e que o AE foi capaz de restaurá-las. Os níveis iniciais de AChE nos diferentes grupos não foram estatisticamente significantes. Entretanto, ensaios *in vitro* mostraram uma reduzida atividade da AChE nos tecidos cerebrais dos animais que receberam AE. As análises também mostraram um aumento no dano oxidativo causado pela A $\beta$  nos animais do grupo controle, mas não nos animais tratados com AE.

Os resultados relatados aqui sugerem que o AE é uma substância com potencial aplicação na DA, por sua capacidade de reduzir os efeitos deletérios dos agregados A $\beta$ <sub>42</sub> e sua ação neuroprotetora. Entretanto, problemas relacionados à absorção por via oral, sua ligação com proteínas no trato gastrointestinal e ainda seu perfil semi-impermeável à BHE indicam a necessidade de desenvolvimento de sistemas de liberação capazes de aumentar o alcance deste composto no SNC. Além disso, a administração do AE em uma forma farmacêutica requerem sua solubilização em solventes seguros e aceitáveis (BALA et al., 2006). Assim, sistemas de liberação estabilizados por tensoativos constituem uma forma de administração promissora do AE, pois

permitted veicular concentrações elevadas de compostos lipofílicos em meio aquoso (SONAJE et al., 2007; AHMED et al., 2012; SPIGNO et al., 2013).

### **1.3 Sistemas estabilizados por tensoativos**

Quando dois líquidos imiscíveis são colocados juntos a força que faz cada um deles resistir à fragmentação é conhecida como tensão superficial. Substâncias que conseguem reduzir esta resistência, ou seja, a tensão superficial, favorecendo a mistura entre dois líquidos imiscíveis, são conhecidos como tensoativos. Moléculas de tensoativos podem se reorganizar na presença de água e óleo formando uma gama de sistemas emulsionados. Os tensoativos podem se localizar na interface óleo/água, resultando em diferentes estruturas de escala macroscópica, microscópica e nanométrica, como as microemulsões, nanoemulsões e cristais líquidos. O que determina a estrutura organizacional obtida com a combinação de água, óleo e tensoativos são o tipo, a estrutura, e a concentração dos óleos e tensoativos utilizados, bem como a técnica de preparação dos sistemas, incluindo a utilização de equipamentos que possibilitem a diminuição do tamanho das gotículas formadas (LAWRENCE, REES, 2000). A Figura 1.13 exibe diferentes estruturas possíveis de serem formadas por misturas de tensoativos, água e óleo.



**Figura 1.13:** Representação esquemática de algumas estruturas possíveis de serem formadas por misturas de água, óleo e tensoativo. Fonte: Adaptado de Lawrence e Rees (2000).

### 1.3.1 Microemulsões e Nanoemulsões

Muita atenção tem sido dada aos sistemas micro e nanoemulsionados por sua capacidade em aumentar a eficácia terapêutica de fármacos, permitindo a redução da dose administrada e minimizando os efeitos colaterais potenciais dos fármacos. Tais sistemas são capazes de compartimentalizar fármacos nas gotículas da fase interna, as quais possuem propriedades físico-químicas bastante diferentes das do meio dispersante, induzindo modificações nas propriedades biológicas dos fármacos incorporados (BHARGAVA, 1987; LAWRENCE, REES, 2012).

Microemulsões são misturas isotrópicas, homogêneas, transparentes termodinamicamente estáveis de um sistema bifásico de óleo e água, estabilizados por tensoativos. Estes sistemas podem ser obtidos de maneira espontânea quando os componentes (principalmente tensoativo, óleo e água), escolhidos de maneira apropriada, são misturados (ANSEL, POPOVICH, ALLEN, 2000; AULTON, 2005). Nanoemulsões (NEs) são emulsões apresentando tamanho de gotícula pequeno e uniforme, geralmente na faixa de 20 a 500 nm. Devido ao seu reduzido tamanho de gotícula, podem ser transparentes, translúcidas ou opalescentes. No entanto, não são termodinamicamente estáveis, e o

tamanho das gotículas tende a aumentar com o tempo. O pequeno tamanho das gotas torna-as estáveis frente aos fenômenos de sedimentação e cremagem por um longo período; assim, as nanoemulsões são consideradas cineticamente estáveis (PEY et al., 2006).

NEs podem ser obtidas por métodos que utilizam elevada ou baixa energia. Métodos de emulsificação que utilizam elevada energia incluem o uso de equipamentos como homogeneizadores de alto cisalhamento (Ultra-turrax), homogeneizadores de alta pressão e geradores de ultrassom. Para a obtenção de emulsões nanométricas, é desejável que tais equipamentos forneçam energia num menor tempo possível e de modo constante. Os homogeneizadores de alta pressão são, portanto, os mais utilizados, pois atendem perfeitamente a estes critérios, além de poderem ser usados industrialmente (SOLANS et al., 2005). Métodos de baixa energia, por sua vez, tiram proveito das propriedades físico-químicas do sistema, permitindo a obtenção de nanoemulsões quase que espontaneamente. O método que emprega a temperatura de inversão de fases (TIF) é um exemplo bastante estudado, e baseia-se na mudança de solubilidade de surfactantes etoxilados com o aumento da temperatura. Em elevadas temperaturas, estes surfactantes tornam-se hidrofílicos, devido à desidratação das cadeias de polioxi-etileno, formando emulsões água em óleo. Já em temperaturas abaixo da TIF, emulsões água em óleo são formadas. O rápido aquecimento e resfriamento da emulsão acima e abaixo da TIF conduz à obtenção de emulsões nanométricas de estreita distribuição de tamanhos e cineticamente estáveis (SOLANS et al., 2005; ALMEIDA, TEIXEIRA, KOESTER, 2008).

A emulsificação espontânea é outro método considerado de baixa energia. Nesse método, a adição de uma solução de óleo e surfactante lipofílico, em um solvente orgânico miscível em água, a uma solução aquosa contendo um surfactante hidrofílico, resulta na formação de nano gotículas da fase oleosa (BOUCHEMAL et al., 2004). Isto ocorre devido a um tipo de instabilidade interfacial conhecida como efeito Maragoni, que por sua vez é decorrente da rápida difusão do solvente orgânico na água e diminuição da tensão interfacial do sistema. No final do processo, o solvente orgânico é removido por evaporação sob pressão reduzida, entretanto, por questões toxicidade, solventes pertencentes às Classe II ou III da Farmacopéia Européia são

preferencialmente utilizados (ALMEIDA, TEIXEIRA, KOESTER, 2008).

Na emulsificação espontânea, as características finais da nanoemulsão são afetadas pela composição quali- e quantitativa da formulação. Em geral, o tamanho da gota diminui com o aumento progressivo do volume de solvente orgânico, o que tem sido relacionado com a maior velocidade de difusão e menor concentração dos componentes da fase oleosa. Além desses, outros parâmetros como viscosidade do óleo e o equilíbrio hidrófilo-lipófilo (EHL) dos surfactantes são determinantes para a qualidade final da preparação. Por fim, este método não requer equipamentos sofisticados e altas temperaturas, o que o torna interessante para estudos de formulação em escala laboratorial (ALMEIDA, TEIXEIRA, KOESTER, 2008).

Com base no tipo de agente emulsionante utilizado na formação das emulsões submicrométricas o/a, tais sistemas podem ser classificados em catiônicos, aniônicos e não-iônicos. Ainda, compostos podem ser adicionados para modificar a carga superficial da partícula incluindo os lipídeos ou polissacarídeos catiônicos, com a finalidade de prolongar e/ou otimizar a liberação do fármaco ou, ainda, propiciar a mucoadesão pela interação eletrostática com tecidos e o muco carregados negativamente. Emulsões preparadas com estearilamina, oleilamina e quitosana podem servir para este propósito (VANDAMME, 2002). A otimização das características superficiais das nanoemulsões também permite a vetorização de fármacos para tecidos e órgãos específicos do corpo humano (TAMILVANAN et al., 2010).

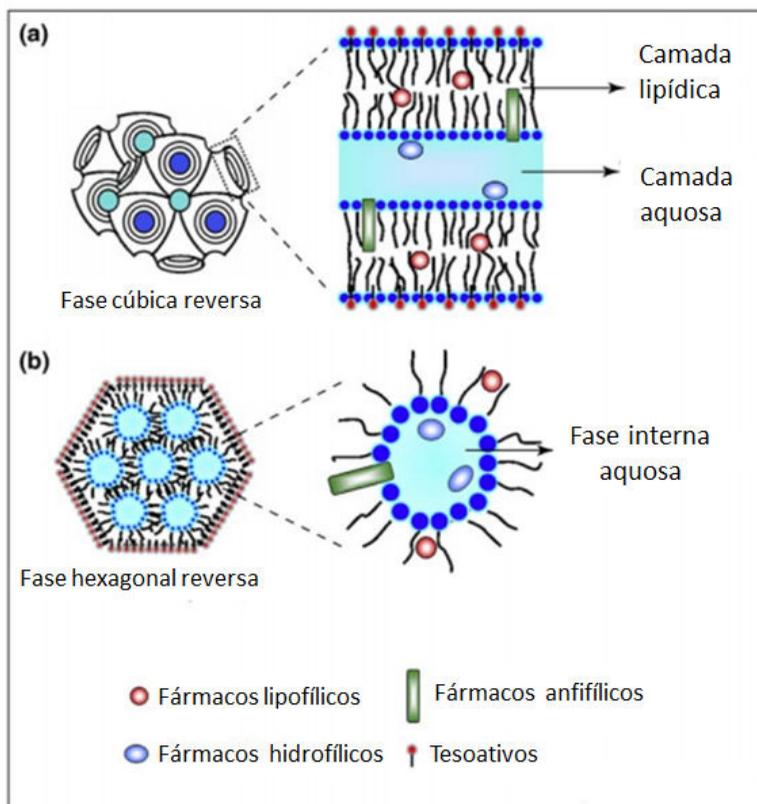
### **1.3.2 Cristais líquidos**

Em 1888, o cientista Friedrich Reinitzer observou a existência de dois pontos de fusão para o benzoato de colesterilo, uma descoberta que hoje, 126 anos após, é amplamente reconhecida como o início da ciência do cristal líquido (LAGERWALL, SCALIA, 2012). O equilíbrio único entre a ordem e a fluidez que caracteriza os cristais líquidos não é apenas profundamente fascinante do ponto de vista científico, mas faz surgir uma gama de fenômenos espectaculares que estão longe de ser totalmente explorados. Os cristais líquidos (CL) constituem uma fase distinta de estruturas condensadas, cujas características físicas os posicionam entre sólidos e líquidos, com parcial ordem/desordem. Por

essa razão, são também chamados de mesofases, em que o prefixo grego *meso* significa intermediário. Materiais que formam cristais líquidos pela adição de solventes são chamados cristais líquidos liotrópicos, enquanto cristais líquidos termotrópicos têm sua estabilidade dependente da temperatura (HOLMBERG, 2001; LAGERWALL, SCALIA, 2012).

Sistemas de cristais líquidos liotrópicos são constituídos de moléculas anfifílicas e solventes, podendo ser classificados em mesofases lamelares, cúbicas e hexagonais. A fase lamelar é formada por camadas paralelas e planares de bicamadas de tensoativo separadas por camadas de solvente, formando uma rede unidimensional. As propriedades físicas da fase cristalina dependem da simetria dos cristais líquidos. Assim, a fase menos ordenada é a mais simétrica que corresponde à fase isotrópica que exibe um comportamento semelhante aos líquidos regulares como a água. Porém há uma infinidade de mesofases menos simétricas, como a fase hexagonal, nas quais os agregados são formados pelo arranjo de cilindros longos formando estruturas bidimensionais. Nos sistemas de fase cúbica, as moléculas estão arranjadas numa estrutura tridimensional, a qual consiste de duas redes congruentes de canais de água envolvidos por bicamadas lipídicas ou de tensoativo (DEMUS et al., 1998; KUMAR et al., 2001).

Nos últimos anos, os CLs têm recebido considerável atenção devido ao seu potencial para a veiculação de fármacos e se potencial mucoadesivo. Entre estes sistemas, as mesofases cúbicas e hexagonais reversas são as mais importantes e têm sido amplamente investigadas pela sua capacidade de prolongar a liberação de fármacos, como moléculas de baixa massa molecular, peptídeos e ácidos nucleicos. Mesofases cúbicas e hexagonais reversas são frequentemente formadas por lipídeos polares em um ambiente aquoso. Esses lipídeos podem absorver certa quantidade de água, formando géis espontaneamente com estruturas únicas, onde fármacos podem ser incorporados. Em geral, géis de cristais líquidos podem ser obtidos pela simples mistura da fase aquosa com a fase lipídica, usando vortex ou ultrassom. Nestes sistemas é possível a veiculação de fármacos de natureza anfifílica, hidrofílica e lipofílica, e sua localização depende das suas características de solubilidade e do tipo de sistema formado (GUO et al., 2010). A Figura 1.14 ilustra a disposição do fármaco, dependendo do tipo de sistema formado: em hexagonal reversa e cúbica.



**Figura 1.14:** Esquema ilustrando as possíveis localização dos fármacos dependendo das características de solubilidade, nas estruturas de (a) fase cúbica reversa e (b), mesofases hexagonal reversa.

Fonte: Adaptado de Guo (2010).

Nguyen e colaboradores (2011) demonstraram a capacidade dos cristais líquidos nanoestruturados em prolongar a absorção de um fármaco pouco solúvel em água, após a administração oral. Para tanto, nanoestruturas cristalinas líquidas cúbicas (cubosomes) contendo cinarizina (CZ) foram obtidas a partir do fitantriol. As concentrações de CZ no plasma foram mantidas na faixa de  $21,5 \pm 1,5$  ng/mL, de 12 a 48 h após a administração oral em ratos. O prolongamento da liberação da CZ a partir dos cubossomos melhorou significativamente ( $p < 0,05$ ) a biodisponibilidade oral (21%), em comparação com a administração de

uma suspensão de CZ (9%) e de uma emulsão de ácido oleico (12%). As análises das nanoestruturas em fluidos gástrico e intestinal simulados, utilizando a difração de raios X em baixos ângulos (SAXS), revelaram a manutenção da estrutura dos cubossomos por mais de 18 horas. Portanto, estes sistemas podem atuar como sistemas de liberação sustentada para fármacos pouco solúveis em água por via oral.

Carvalho e colaboradores (2013) desenvolveram um sistema de liberação de fármacos na forma de cristais líquidos, com propriedades mucoadesivas, para a administração de zidovudina (AZT) por via nasal. O sistema era constituído de uma mistura de PPG-5-CETETH-20, ácido oleico e água (55: 30: 15% p/p), e apresentava baixa viscosidade, comportamento de fluxo newtoniano e isotropia. Quando diluído na proporção de 1:1 (m/m) com muco nasal artificial, os autores observaram a alteração para uma fase lamelar anisotrópica, com força mucoadesiva três vezes maior, determinada em texturômetro usando a mucosa nasal suína ou um disco de mucina. Estudos de permeação utilizando células do tipo Franz e mucosa nasal suína como modelo de membrana mostraram um aumento de 18 vezes na permeabilidade do AZT na formulação. Assim, com a caracterização físico-química e os estudos de permeação, os autores concluíram que tal sistema forma uma matriz mucoadesiva que em contato com o muco nasal promove a absorção do AZT.

Gosenca e colaboradores (2013) desenvolveram sistemas de liberação tópica com estrutura líquido-cristalina para o palmitato de ascorbilo, um derivado do ácido ascórbico utilizado como antioxidante, para prevenir o envelhecimento da pele. Para otimizar a formulação, um diagrama de fases pseudoternário foi construído utilizando Tween 80/lecitina /miristato de isopropilo/água, com uma proporção de Tween 80/lecitina de 1/1, e a região de formação de cristais líquidos lamelares foi identificada. Algumas formulações de cristal líquido lamelar foram selecionadas e caracterizadas. A avaliação da citotoxicidade *in vitro* dos sistemas foi realizada usando cultura de células de queratinócitos. Os resultados obtidos sugerem que os cristais líquidos lamelares podem ser utilizados como um sistema de liberação tópica fisiologicamente aceitável.

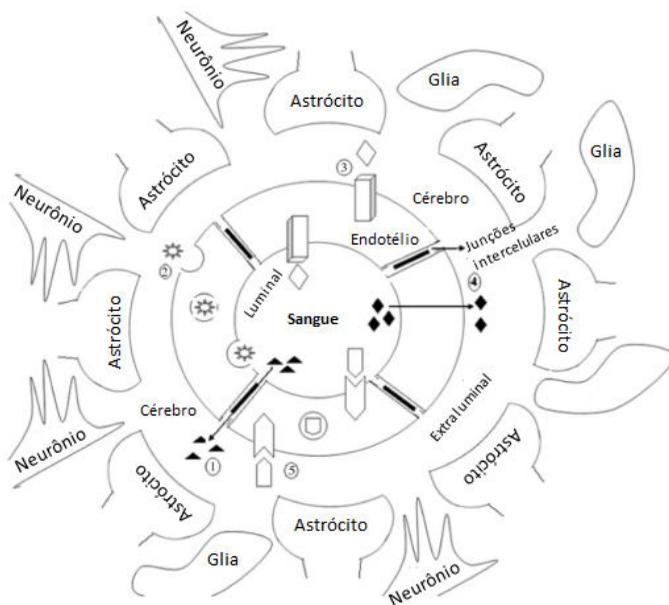
## 1.4 Sistemas de liberação de fármacos para o SNC

Doenças relacionadas com o SNC, tais como esquizofrenia, meningite, enxaqueca, doença de Parkinson e Doença de Alzheimer exigem, para o seu tratamento, o alcance de concentrações terapêuticas dos fármacos no cérebro (PARDRIDGE, 1999). Muitos compostos candidatos a fármacos para o tratamento de distúrbios do SNC, no entanto, são abandonados em ensaios pré-clínicos por não serem capazes de atingir o parênquima cerebral. Embora sejam bem absorvidos por vias extravasculares, atingindo a circulação sistêmica, os fármacos ainda encontram dois tipos de barreiras fisiológicas que separam o cérebro do seu suprimento sanguíneo. Estas barreiras controlam o transporte de compostos da corrente sanguínea para o SNC, visto que muitas substâncias, mesmo as que consumimos em nossa dieta e que não causam danos a órgãos periféricos, são de fato neurotóxicas. Duas barreiras são responsáveis por restringir a passagem de substâncias do sangue para o SNC: a barreira hematoencefálica (BHE) e a barreira líquido-encefálica (BLE) (HAWKINS, DAVIS, 2005; ALAM et al., 2010).

A BHE é formada de células endoteliais especializadas que revestem os capilares e protegem o cérebro de substâncias nocivas do fluxo de sanguíneo. A BHE foi observada pela primeira vez por Paul Ehrlich após injeção endovenosa de azul de tripan em animais. A coloração azul típica deste composto foi detectada em todos os órgãos menos no SNC, levando à hipótese da existência de dois compartimentos (HAWKINS, DAVIS, 2005). Entretanto, a anatomia da BHE só foi elucidada muitos anos depois. A BHE é compreendida pelo endotélio capilar cerebral, que é estruturalmente diferente daquele de outros tecidos. Esta diferença se deve à existência de junções oclusivas entre as células endoteliais, que excluem o mecanismo de transporte paracelular. Em adição às células endoteliais, a microvasculatura também apresenta perícitos (células fagocíticas) localizadas no lado cerebral do endotélio, os quais compartilham a mesma membrana basal com as células endoteliais. No cérebro, os neurônios são sustentados por um *scaffold* de células gliais, chamadas astrócitos, que desempenham funções como nutrição dos neurônios e regulação da concentração de compostos e neurotransmissores. Além da barreira proporcionada pela BHE, enzimas presentes nas células endoteliais, perícitos e astrócitos

metabolizam compostos, restringindo a entrada dos mesmos no cérebro. A entrada de substância no cérebro é também restringida pela presença da Pgp (glicoproteína P), que atua como uma bomba de efluxo, removendo para fora das células as substâncias que permeiam através das células endoteliais. A BHE é encontrada no cérebro e medula espinhal, exceto em um pequeno número de regiões isoladas no cérebro que delimitam os ventrículos. Estes órgãos circunventriculares incluem o plexo coroide, a eminência mediana do hipotálamo, o órgão subfornical no teto do terceiro ventrículo e a área postrema na base do quarto ventrículo (PARDRIDGE, GOLDEN, 2001). Além da função de barreira, a BHE tem várias funções como a manutenção neuronal, homeostase do tecido, regulação do tônus vascular, fibrinólise e coagulação, ativação de células do sangue e migração durante os processos fisiológicos que são essenciais para a saúde e a função do SNC (RISAU, 1995). A barreira líquor-encefálica (BLE), por sua vez, além de restringir a entrada de substâncias para o SNC, possui outras funções como secretar o líquido cefalorraquidiano (LCR) através das células epiteliais do plexo coróide, que é o líquido que circula em torno do cérebro e da coluna espinhal (ENGELHARDT, SOROKIN, 2009).

Para o perfeito funcionamento cerebral é necessário, entretanto, o aporte de algumas substâncias oriundas do sangue, essenciais para a manutenção do cérebro. Compostos como glicose, corpos cetônicos, e ácido láctico (um subproduto do metabolismo dos açúcares), os quais são responsáveis pelo fornecimento de energia, são transportados para o cérebro por um mecanismo de transporte mediado por carreadores. Este tipo de transporte também está envolvido na captura de aminoácidos a partir da corrente sanguínea. Entretanto, a maioria dos fármacos é absorvida por difusão passiva através das células, pela via transcelular, já que a via paracelular é impedida pela presença das junções oclusivas. Assim, compostos lipofílicos capazes de atravessar as membranas são mais permeáveis, existindo uma estreita relação entre o coeficiente de partição do fármaco e sua permeabilidade através da BHE. O outro mecanismo, a transcitose mediada por receptores permite a passagem de macromoléculas como peptídeos, os quais são internalizados por vesículas endocíticas. Por exemplo, a insulina alcança o cérebro por meio da transcitose mediada por um receptor endotelial de insulina (PARDRIDGE, GOLDEN, 2001). A Figura 1.15 ilustra os mecanismos de transporte de compostos através da BHE.



**Figura 1.15:** Diagrama de um capilar cerebral que forma a BHE em associação com os astrócitos e células da glia. As principais vias para o transporte de moléculas através da BHE encontram-se demonstrados. (1) via intercelular, cujo transporte de compostos hidrofílicos, incluindo fármacos polares é limitado, devido à presença das junções oclusivas; (2) transcitose adsorptiva, que é um mecanismo de transcitose e endocitose mediado por processos de adsorção, responsável, por exemplo, pela passagem de proteínas plasmáticas como a albumina para o cérebro; (3) Proteínas de transporte, as células endoteliais possuem carreadores proteicos para colina, aminoácidos, glicose, purina e nucleotídeos; (4) via transcelular, é uma via de difusão efetiva para compostos lipofílicos (5) transcitose mediada por receptor, transporte por endocitose e transcitose mediado por receptores específicos para certas proteínas, como insulina e transferrina.  
Fonte: Adaptado de Alam e colaboradores (2010).

Estudos têm mostrado que 100% das moléculas grandes e cerca de 98% de moléculas pequenas não conseguem atravessar a BHE em condições fisiológicas. Para que uma molécula presente na circulação

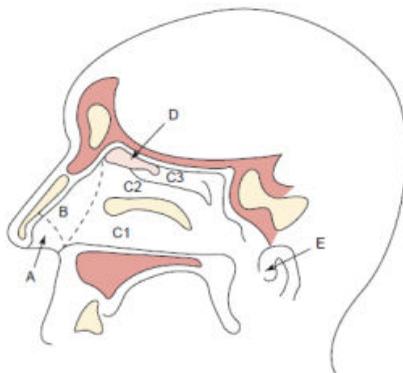
sistêmica atravessa a BHE em quantidades significativas, elas devem apresentar duas características: possuir massa molecular menor que 400 Da e elevada solubilidade nos lipídeos (ALAM et al., 2010). Assim, várias estratégias têm sido investigadas com o intuito de contornar a BHE e obter resultados clínicos efetivos para muitas das condições que afetam o SNC. Estas estratégias incluem a administração direta no SNC pelas vias intracerebral, intraventricular e intratecal, a ruptura temporária da BHE e a administração nasal. Esta última envolve o sistema nervoso olfativo ou trigêmeo que inicia no cérebro e termina na cavidade nasal no epitélio olfatório. Portanto, a passagem de substâncias da mucosa nasal para o SNC ocorre principalmente através do bulbo olfatório. É uma via não invasiva que permite a liberação de fármacos de baixa e elevada massa molecular no SNC, além de possibilitar a redução da dose e ser de fácil acesso permitindo a auto-administração (ALAM et al., 2010). Uma vez que a administração nasal é objetivada neste trabalho, as características desta via serão abordadas com mais detalhes a seguir.

### **1.5 Administração de fármacos pela via nasal**

As funções primordiais da cavidade nasal são a respiração e a olfação. Fisiologicamente, a função da cavidade nasal também inclui ressonância para a produção de sons, filtração de partículas, depuração mucociliar, atividades imunológicas e aquecimento e umidificação do ar inspirado antes de alcançar os pulmões (CHIEN, CHANG, 1987). A cavidade nasal é dividida pelo septo nasal em duas metades abertas para o lado facial e da rinofaringe. Cada cavidade nasal pode ser dividida em diferentes regiões: vestibulo nasal, átrio, região olfatória e região respiratória (Figura 1.16). O epitélio olfativo está localizado no alto da cavidade nasal no homem e recobre a lâmina crivosa, uma estrutura óssea que contém muitos poros que permitem a passagem dos feixes neuronais a partir do epitélio olfativo para o SNC (MISTRY, STOLNIK, ILLUM, 2009).

A cavidade nasal humana tem volume total de 15 a 20 mL e área superficial total de aproximadamente 150 cm<sup>2</sup>, sendo que a região respiratória corresponde à 85% desta área (MORRISON, CONSTANZO, 1990). A cavidade nasal é recoberta por uma camada de

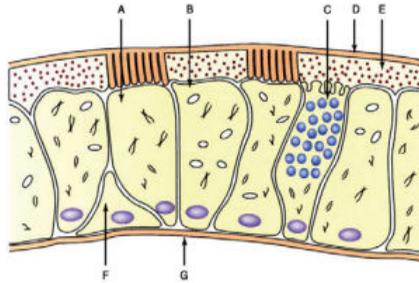
muco de 5 a 20  $\mu\text{m}$  de espessura (ARORA, SHARMA, GARG, 2002). O muco é constituído por 95% de água, 2% de mucina, 1% de sais, 1% de albumina, imunoglobulinas, lisozima, lactoferrina e outras proteínas, e 1% de lipídios. O muco nasal também contém IgA, IgE, e IgG (SCHIPPER, VERHOEF, MERKUS, 1991).



**Figura 1.16:** Representação esquemática de uma secção sagital da cavidade nasal humana mostrando: (A) vestíbulo nasal, (B) átrio, (C) região respiratória, (C1) corneto inferior (C2) corneto médio, e (C3) corneto superior (D) região olfatória e (E) nasofaringe. Fonte: (SWAMY, ABBAS, 2012).

A parte anterior do nariz, compreendida pelo vestíbulo nasal até a concha nasal, apresenta um epitélio escamoso estratificado. A parte superior da cavidade nasal, que abrange 5% da superfície total, é a membrana olfativa. Esta última apresenta células sensitivas olfativas, assim como células serosas e mucóides. A maior parte da cavidade nasal, contudo, é revestida por uma membrana mucóide que contém uma mistura de células colunares, calciformes e basais (Figura 1.17). As células colunares presentes no terço anterior do epitélio são células não ciliadas, enquanto que as restantes são ciliadas. Os cílios são pequenas projeções piliformes localizadas sobre a superfície exposta das células epiteliais. Cada célula contém em torno de 300 cílios, que medem entre 5 e 10  $\mu\text{m}$  de comprimento e 0,1 a 0,3  $\mu\text{m}$  de diâmetro. Esses cílios ondulam em ritmo uniforme, com uma frequência de 10 Hz e são bastante eficazes na remoção de partículas inaladas de diâmetro de 0,5 a 3  $\mu\text{m}$ , à medida que o tamanho de partícula diminui, esta remoção se

torna mais difícil. A função dos cílios é facilitar o movimento do muco da cavidade nasal para a nasofaringe e, finalmente, para o trato gastrointestinal. O tempo estimado total de reposição do muco varia de 10 a 15 minutos aproximadamente, sendo a meia vida de depuração mucociliar estimada em 20 minutos e a taxa de depuração em torno de 5 mm/min. O efeito combinado desses cílios é denominado depuração mucociliar. A depuração mucociliar é basicamente uma função de defesa, mas que constitui uma barreira à absorção de fármacos (ILLUM, 2000; AULTON, 2005; DOUGLAS, 2006).



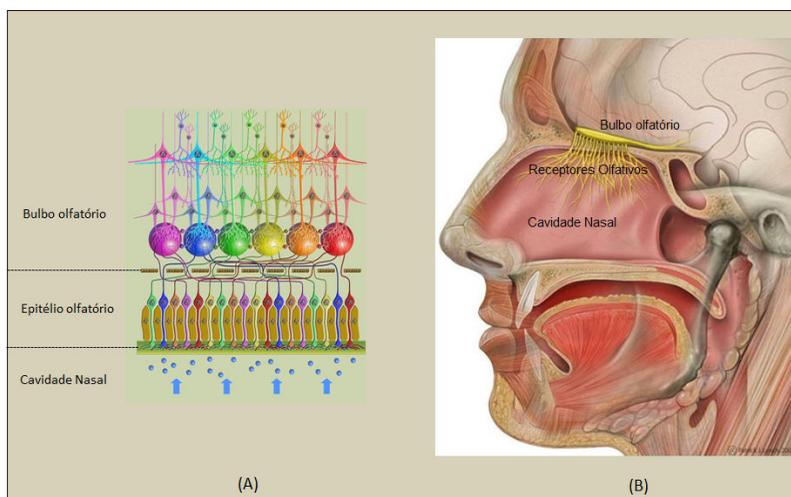
**Figura 1.17:** Representação do epitélio nasal mostrando: (A) células ciliadas, (B) células não ciliadas, (C) células caliciformes, (D) camada de muco gel, (E) camada de muco sol, (F) células basais, e (G) membrana basal.

Fonte: (SWAMY, ABBAS, 2012).

A região olfativa, constituída pelo bulbo olfatório (Figura 1.18) é o local mais importante para a passagem de fármacos para o cérebro através de vários mecanismos de transporte, incluindo transcelular, paracelular, olfativo e vias neurais do trigêmeo (WU, HU, JIANG, 2008; MISTRY, STOLNIK, ILLUM, 2009). Esta região da mucosa nasal contém células olfativas que se estendem até a cavidade cerebral. Quando a formulação contendo um fármaco é instilada na cavidade nasal, entra em contato com a mucosa e são transportados para o cérebro, evitando a BHE, e alcançando mais rapidamente o líquido cefalorraquidiano (WESTIN et al., 2005; WESTIN et al., 2006).

O bulbo olfatório representa, portanto, o método mais direto e não invasivo de entrada de substâncias para o cérebro. Uma terapia não invasiva é necessária principalmente para pessoas com doenças crônicas

(demência e DA), que necessitam da administração contínua de medicamentos (MISTRY, STOLNIK, ILLUM, 2009). Esta via não invasiva pode ser uma alternativa para a administração de fármacos que atuam no SNC, mas que exibem baixa biodisponibilidade oral e que não consigam atravessar a BHE. A administração de fármacos pela via nasal favorece a passagem para o SNC, mas estes também podem alcançar a circulação sistêmica através da mucosa nasal. Neste caso, é necessário que o fármaco consiga atravessar a BHE ou então esta fração será metabolizada e excreta sem produzir efeito terapêutico (COSTANTINO et al., 2007).



**Figura 1.18:** No sistema olfatório humano, o bulbo olfatório (A) processa e distribui as informações olfativas para o cérebro, onde ocorre a codificação. Esta comunicação íntima do bulbo olfatório com a cavidade nasal permite que a administração de fármacos pela via nasal (B) consiga alcançar o SNC.

Fonte: Adaptado de Harrer; Thomas; Meyerson (2014) e Lynch (2006).

Mesmo que a administração nasal permita transpor a BHE, o curto tempo de permanência da forma farmacêutica na cavidade nasal, a presença de enzimas e o reduzido volume de formulação que pode ser instilado limitam a absorção de fármacos por esta via. Assim, estratégias têm sido utilizadas para aumentar a biodisponibilidade de fármacos pela via nasal. Dentre estas estratégias está incluída a encapsulação de

compostos ativos em nano e micropartículas (DALPIAZ et al., 2007; KUMAR et al., 2008; SOOD, JAIN, GOWTHAMARAJAN, 2014). Tais sistemas são capazes de proteger o fármaco encapsulado frente à degradação química e enzimática, além de propiciar uma elevada superfície de contato com a mucosa nasal em decorrência de seu tamanho reduzido (MISTRY, STOLNIK, ILLUM, 2009).

Uma característica importante da cavidade nasal é o fato de o seu epitélio ser revestido com uma fina camada de muco com espessura de cerca de 5  $\mu\text{m}$  secretado pelas células caliciformes. A capacidade de adesão do sistema no muco tem sido utilizada com sucesso para prolongar o contato de sistemas de liberação com as mucosas, favorecendo a absorção da substância ativa. Sistemas mucoadesivos interagem com a mucina e outras substâncias contidas no muco por meio da formação de ligações químicas fracas incluindo ligações iônicas, forças de Van der Waals, e ligações de hidrogênio (LEE, PARK, ROBINSON, 2000; VARUM et al., 2008; SERRA, DOMÉNECH, PEPPAS, 2009).

Zhang e colaboradores (2004) desenvolveram ME de nimodipino para a administração nasal com o intuito de aumentar as concentrações do fármaco no SNC. A microemulsão escolhida para a administração nasal em ratos foi a que continha 8% de Labrafil M 1944CS, 30% de Cremophor RH 40/etanol (3:1) e água. Após uma única administração nasal da microemulsão na dose de 2 mg/kg, o pico de concentração plasmática ocorreu em 1 h e a biodisponibilidade foi de aproximadamente 32%. As razões da área sob a curva (ASC) obtida após análise do fármaco no cérebro e líquido cefalorraquidiano em comparação com plasma, após a administração nasal, foram significativamente maiores do que os valores obtidos após administração endovenosa. Estes resultados sugerem que a microemulsão é um sistema promissor para a administração nasal de nimodipino para o tratamento e prevenção de doenças neurodegenerativas.

Gao e colaboradores (2007) avaliaram a biodistribuição, a captura cerebral e o efeito neuroprotetor de um peptídeo intestinal vasoativo (PIV) encapsulado em nanopartículas de metoxi polietilenoglicol-ácido polilático (MePEG-PLA) modificadas com aglutinina de gérmen de trigo, após administração nasal. Os autores observaram que a área sob a curva do  $^{125}\text{I}$ -PIV intacto foi aproximadamente 4,7 e 7,7 vezes maior após a administração nasal das

nanopartículas de MePEG-PLA e de nanopartículas de MePEG-PLA conjugadas com aglutinina, respectivamente, quando comparado com a solução do peptídeo marcado administrado pela mesma via. Melhorias na memória espacial de ratos tratados com etilcolina azirídio também foram observadas após administração nasal de 25 mg/kg e 12,5 mg/kg de PIV encapsulado nas nanopartículas de MePEG-PLA e nanopartículas de MePEG-PLA modificadas com aglutinina, respectivamente. Estes resultados indicaram que as nanopartículas de MePEG-PLA conjugadas com aglutinina aumentaram a captura do peptídeo no SNC, por um mecanismo em que a absorção nasal foi aumentada pela interação da aglutinina com a camada de muco, em especial, com a mucina.

MEs mucoadesivas para administração nasal da tacrina também foram desenvolvidas por Jogani e colaboradores (2008), utilizando Labrafil M 1944 CS como fase oleosa (15%), Cremophor RH 40 como tensoativo (41,25%), Transcutol P como co-tensoativo (13,75%), e água destilada (30%), como uma fase aquosa. A tacrina (1,2,3,4-tetra-hidro-9-aminoacridina) é inibidor reversível da acetilcolinesterase e foi o primeiro fármaco aprovado pela Food and Drug Administration (FDA) em 1993 para o tratamento dos sintomas leves a moderados da DA, mas está em desuso por seu efeito hepatotóxico. Estudos de biodistribuição em ratos da tacrina marcada com tecnécio após administração da microemulsão, microemulsão mucoadesiva e de uma solução de tacrina, via nasal e endovenosa, foram realizados. Esses estudos demonstraram a maior concentração de fármaco no SNC quando a ME mucoadesiva foi administrada por via intranasal. Assim, os resultados sugerem possível vetorização da tacrina contida na ME mucoadesiva por via intranasal para o tratamento de doença de Alzheimer.

Kumar e colaboradores (2008) desenvolveram NE de risperidona utilizando o Capmul MCM como fase oleosa e Tween 80 como tensoativo. Uma mistura de transcutool e propilenoglicol (1:1, m/m) foi utilizada como co-tensoativo e água destilada como a fase aquosa. As nanoemulsões mucoadesivas foram obtidas com a adição de 0,5% de quitosana ao final do processo de preparação. Visto que o objetivo dos autores foi administrar estas NE mucoadesivas por via nasal com expectativa de aumentar a concentração do fármaco no SNC, estudos de biodistribuição com marcação radioativa para a risperidona foram realizados para comparar as vias de administração (intranasal e endovenosa) e o tipo de formulação (solução de risperidona, NE de

risperidona e NE mucoadesiva de fármaco). A relação cérebro/sangue da captação da risperidona após 0,5 h foi de 0,054 após administração da solução endovenosa, 0,617 após a administração da solução nasal, 0,754 após administração da NE nasal e 0,948 após a administração da NE mucoadesiva pela via nasal. Estes resultados evidenciaram não somente a vantagem da administração deste fármaco pela via nasal, mas também que o uso de NEs mucoadesivas conduziram ao aumento da biodisponibilidade do fármaco no SNC, devido provavelmente ao aumento do tempo de permanência da formulação na cavidade nasal.

Mandal e Mandal (2010) desenvolveram ME de Carbamazepina, utilizando Labrafil M 1944 CS como óleo, Accenon CC como tensoativo e Transcutol P como co-tensoativo pelo método de titulação. Um diagrama de fases pseudoternário foi construído com o intuito de identificar a região em que a proporção de tensoativo, óleo e água conduz à obtenção de microemulsões. Microemulsões mucoadesivas contendo carbamazepina foram preparadas utilizando o Carbopol 934, visando a vetorização do fármaco no SNC, após administração nasal. Estudos de liberação do fármaco a partir das formulações através da mucosa nasal de ovelhas foram realizados utilizando células de difusão tipo Franz. Os resultados revelaram a liberação de 29% do fármaco a partir da ME mucoadesiva, enquanto 17,6% foram liberados a partir da ME preparada sem a presença do Carbopol 934. As ME se mantiveram estáveis durante 6 meses e, com base nos resultados, os autores concluíram que a administração de MEs mucoadesivas pela via nasal constitui uma forma alternativa para liberação da carbamazepina no SNC.

---

---

**CAPÍTULO 2: DESENVOLVIMENTO DE NANOEMULSÕES  
CATIÔNICAS DE ÁCIDO ELÁGICO E AVALIAÇÃO DAS  
PROPRIEDADES MUCOADESIVAS E DA PERMEAÇÃO  
ATRAVÉS DA MUCOSA NASAL**

---

---

## 2.1 Introdução

O ácido elágico (AE), um derivado dimérico do ácido gálico, é um composto fenólico encontrado em frutas como o morango, romã, framboesa, amora, entre outras (PRIYADARSINI et al., 2002). Dentre os inúmeros benefícios que este composto tem mostrado, destaca-se a sua ação anti-amilodogênica e neuroprotetora, que parece estar associada a sua potente atividade antioxidante. Entretanto, para que este composto possa ser aproveitado para o tratamento da Doença de Alzheimer, é preciso que concentrações terapêuticas efetivas atinjam o SNC. O ácido elágico apresenta baixa solubilidade aquosa, elevado metabolismo no trato gastrointestinal e de primeira passagem e ligação irreversível ao ADN e proteínas celulares, além de ser semi-impermeável à BHE, o que exclui o emprego da via oral para fins terapêuticos (WHITLEY et al., 2003). Assim, a administração nasal do ácido elágico foi proposta neste trabalho, uma vez que esta via permite o transporte direto de substâncias bioativas diretamente ao cérebro, com diminuição do metabolismo hepático, através da região olfatória localizada no teto da cavidade nasal (WATTANATHORN et al., 2007; TONG-UM et al., 2010). Entretanto, estratégias farmacotécnicas são necessárias para contornar as limitações da administração nasal de medicamentos, que são o pequeno volume da forma farmacêutica que pode ser instilado e a sua rápida remoção da cavidade nasal (BOUCHEMAL et al., 2004; ALMEIDA, TEIXEIRA, KOESTER, 2008).

Emulsões são preparações farmacêuticas obtidas pela dispersão de duas fases líquidas imiscíveis ou praticamente imiscíveis com auxílio de um sistema emulsionante adequado. Entretanto, emulsões mais interessantes do ponto de vista farmacêutico são as emulsões submicrométricas, denominadas nanoemulsões, as quais apresentam gotículas de fase interna geralmente na faixa de 200 a 500 nm, e conseguem veicular concentrações elevadas de fármacos lipofílicos em meio aquoso. Além disso, as nanoemulsões apresentam um elevado grau de dispersibilidade, o que permite o íntimo contato da forma farmacêutica com a mucosa onde deve ocorrer a absorção, além de proteger o fármaco contra a degradação em meio fisiológico e liberar controladamente a substância ativa (BOUCHEMAL et al., 2004;

SONAJE et al., 2007; ALMEIDA, TEIXEIRA, KOESTER, 2008; AHMED et al., 2012; SPIGNO et al., 2013).

Por outro lado, as nanoemulsões devem apresentar características físico-químicas adequadas ao seu propósito, além do tamanho reduzido de gotícula. Em especial para administração nasal, tais sistemas devem apresentar isotonia, pH próximo ao fisiológico e baixa viscosidade, de modo a facilitar a sua administração (KLANG, BENITA, 1998; ARORA, SHARMA, GARG, 2002; TADROS et al., 2004). Ainda, o uso de nanoemulsões que apresentam carga superficial positiva elevada é particularmente vantajoso para administração nasal. Nanoemulsões catiônicas são passíveis de interagir com muco carregado negativamente, por meio de interações eletrostáticas, aumentando o tempo de permanência da forma farmacêutica no sítio de absorção. O uso de nanoemulsões catiônicas, com este propósito, tem sido explorado em uma nova plataforma tecnológica que visa o aumento da biodisponibilidade ocular de fármacos (LALLEMAND et al., 2012), entretanto, pouco tem sido descrito visando a administração nasal, e unicamente como adjuvante para fins de imunização por esta via (WONG et al., 2014). Nanoemulsões catiônicas podem ser obtidas por meio da associação de fosfolípídeos e lipídeos catiônicos com estabilizantes, entre eles, a estearilamina, oleilamina, dioleoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DOPE) e 2-dioleil-3-trimetilamônio-propano (DOTAP). Podem ser obtidas por inúmeros métodos, incluindo a homogeneização por alta pressão e microfluidização, que utilizam equipamentos para fornecer energia ao sistema, e a emulsificação espontânea, a qual é baseada na dispersão de uma solução do óleo em um solvente hidromiscível em uma fase aquosa. Este último método foi utilizado neste trabalho tendo em vista a facilidade de execução, não necessitar de equipamentos específicos, não empregar temperaturas elevadas, e conduzir à formação de sistemas monodispersos, sendo, portanto, útil em estudos de formulação em escala laboratorial (MAA, HSU, 1999; TADROS et al., 2004; ALMEIDA, TEIXEIRA, KOESTER, 2008; BHATT, MADHAV, 2011). Assim, este primeiro capítulo aborda o desenvolvimento de nanoemulsões catiônicas contendo ácido elágico, assim como a avaliação da atividade antioxidante, das propriedades mucoadesivas e do perfil de permeação do ácido elágico livre e nanoemulsionado através da mucosa nasal. Para isso, o desenvolvimento e validação de uma metodologia analítica para

determinação do ácido elágico foi realizado, e estes resultados também serão mostrados neste capítulo.

## **2.2 Materiais**

### **2.2.1 Materias primas**

- Ácido elágico (Sigma Aldrich, Alemanha)
- Cloreto de cetiltrimetilamônio (Sigma Aldrich, Alemanha)
- Mucina submaxilar bovina (Sigma Aldrich, Alemanha)
- Borato de sódio (Sigma Aldrich, Alemanha)
- Lecitina de Soja 100% de fosfatidilcolina (Lipoid, Alemanha)
- Oleilamina (Sigma Aldrich, Alemanha)
- Estearilamina (Sigma Aldrich, Alemanha)
- Triglicerídeos de cadeia média (Brasquim, Brasil)

### **2.2.2 Solventes e reagentes**

- Álcool etílico (Synth, Brasil)
- Álcool metílico (Vetec, Brasil)
- Hidróxido de sódio (Cromoline, Brasil)
- Fosfato de Sódio (Vetec, Brasil)
- PEG 400 (Viafarma, Brasil)
- Cloreto de sódio (Isofar, Brasil)
- Ácido acético glacial (Vetec, Brasil)

### **2.2.3 Equipamentos**

- Agitador Magnético de 6 pontos (Dist, Brasil)
- Balança Analítica Ohaus Corporation AS 2005 (Estados Unidos)
- Balança Katashi
- Banho de ultrasson Unique (Brasil)
- Banho para células de difusão tipo Franz (Dist, Brasil)
- Centrífuga Sigma 4K15
- Cromatógrafo Líquido Perkin Elmer 200 series, equipado com uma bomba series 200, degaseificador series 200, detector series 200 e sistema controlador series 600 (EUA).
- Espectrofotômetro de Fluorescência (Hitachi, Japão)

- Espectrofotômetro Infravermelho FTIR Frontier (PerkinElmer, Brasil)
- Espectrofotômetro Shimadzu UV-1800 (Kioto, Japão)
- Evaporador rotatório Marconi (São Paulo, Brasil)
- Microscópio Eletrônico de Transmissão 100 KV JEOL JEM-1011 (Japão)
- Potenciômetro Oakaton (Acorn series, EUA)
- Zetasizer Nanoseries (Malvern Instruments, Reino Unido)

## **2.3 Metodologia**

### **2.3.1 Preparação das nanoemulsões catiônicas**

As nanoemulsões catiônicas foram preparadas pelo método de emulsificação espontânea descrito por Bouchemal e colaboradores (2004). A fase orgânica contendo o óleo (triglicerídeos de cadeia média, TCM), lecitina de soja (100% fosfatidilcolina), o lipídio catiônico, e ácido elágico, dissolvidos em etanol, foram adicionados a uma fase aquosa contendo glicerina, mantida sob agitação magnética. Como tensoativos hidrofílicos, o Pluronic F68, Solutol HS15 e o Tween 80 foram testados. Após a formação das nanoemulsões, o pH das formulações foi ajustado a 6,0 e as dispersões coloidais resultantes foram levadas à evaporação sob pressão reduzida para eliminação do solvente orgânico e concentração até o volume final desejado (10 mL). Para a obtenção das nanoemulsões, estudos iniciais foram realizados, testando-se diferentes componentes da formulação, tais como tipo e concentração de tensoativo hidrofílico e lipofílico, tipo e concentração de óleo e tipo e concentração de lipídeo catiônico. Todas as formulações foram preparadas em triplicata. Nanoemulsões brancas (sem fármaco) foram preparadas pelo mesmo método.

### **2.3.2 Caracterização físico-química e morfológica das nanoemulsões**

#### **2.3.2.1 Determinação do diâmetro médio e potencial zeta**

O diâmetro médio e potencial zeta das nanoemulsões foram determinados por espectroscopia de correlação fotônica e anemometria laser-Doppler, respectivamente utilizando um Zetasizer Nano Series (Mavern Instruments, Worcestershire, UK). As medidas foram realizadas a 25 °C após diluição apropriada das amostras em água destilada. Cada análise de tamanho teve duração de 120s e foi obtida com um ângulo de detecção de 173°. Para determinação do potencial zeta, as amostras foram colocadas em célula eletroforética, em que o

potencial de  $\pm 150\text{mV}$  foi estabelecido. Os valores de potencial zeta foram calculados a partir da média dos valores de mobilidade eletroforética obtidos, usando a equação de Smoluchowski.

### **2.3.2.2 Determinação do pH**

O pH das nanoemulsões foi determinado utilizando potenciômetro Oakaton (USA), previamente calibrado com soluções tampão pH 4 e 7, por meio da inserção direta dos eletrodos na amostra, sem diluição.

### **2.3.2.2 Avaliação morfológica das nanoemulsões**

As nanoemulsões foram analisadas por microscopia eletrônica de transmissão (MET) utilizando um microscópio EM-1011 – 100 kV (Tóquio, Japão). As nanoemulsões foram diluídas em água e gotejadas sobre grids de cobre (200 mesh) revestidos com filme de carbono e corados com ácido fosfotúngstico. As micrografias foram obtidas com aumentos entre 3.000 e 80.000 vezes.

### **2.3.2.3 Espectroscopia de Infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR)**

Os espectros de absorção no infravermelho foram obtidos em um espectrofotômetro de FTIR Frontier (PerkinElmer, Brasil). Os compostos puros, sua mistura físicas (1:1) e as nanoemulsões contendo AE foram analisados com o intuito de verificar a presença de interações entre os componentes da formulação. As leituras das amostras foram efetuadas entre  $4000$  e  $600\text{ cm}^{-1}$ .

### **2.3.3 Determinação do teor e eficiência de encapsulação do ácido elágico nas nanoemulsões catiônicas**

### **2.3.3.1 Condições de análise**

O teor e eficiência de encapsulação do ácido elágico nas nanoemulsões catiônicas foram determinados por espectrofotometria de fluorescência, conforme descrito por Wang e colaboradores (2011). Estes autores otimizaram a indução da fluorescência do AE cuja melhor condição foi 2,0 mL de solução tampão de borato de sódio/HCl 0,05 mol/L pH 7,0 e 1,0 mL de solução aquosa de cetiltrimetilamônio (CTAB, 0,05 mol/L).

### **2.3.3.2 Validação do método analítico por espectrofotometria de fluorescência**

O método de espectrofotometria de fluorescência descrito acima foi validado quanto aos parâmetros de especificidade, linearidade, robustez, limite de detecção e quantificação, precisão e exatidão, conforme descrito no ICH (2005).

#### **2.3.3.2.1 Especificidade**

Para determinar a especificidade do método foram preparadas nanoemulsões catiônicas isentas de ácido elágico (nanoemulsões brancas) e analisadas conforme descrito em 2.3.3.1. O espectro de emissão de fluorescência das nanoemulsões isentas de fármaco foi comparado com aquele obtido a partir de uma solução padrão de ácido elágico (0,1 mg/mL), analisado nas mesmas condições.

#### **2.3.3.2.2 Linearidade**

A linearidade do método foi avaliada por meio da construção de uma curva analítica contendo 10 pontos. As curvas de calibração foram construídas em triplicata, em três dias diferentes, por meio de diluições adequadas de uma solução metanólica padrão de ácido elágico 100  $\mu$ g/mL de modo a obter concentrações finais de 0,5; 0,75; 1; 1,5; 2; 3; 4; 5; 6 e 7  $\mu$ g/mL. A partir dos resultados, gráficos de intensidade de fluorescência a 388 nm *versus* concentração foram construídos, e o coeficiente de correlação e a equação da reta foram obtidos pelo método

dos mínimos quadrados, usando o Software Prism<sup>®</sup> (Graphpad software, EUA).

### 2.3.3.2.3 Limite de quantificação e detecção

Os limites de quantificação (LQ) e detecção (LD) do método foram calculados usando as seguintes equações:

$$LQ = \frac{10\sigma}{s} \qquad LD = \frac{3,3\sigma}{s}$$

Em que:

$\sigma$  é o desvio padrão do intercepto com o eixo do Y, obtido a partir de três curvas de calibração, e  $s$  é a inclinação média da curva de calibração

### 2.3.3.2.4 Precisão

A precisão do método analítico foi determinada por meio dos ensaios de repetibilidade e de precisão intermediária. A repetibilidade foi examinada após seis análises de cada amostra, no mesmo dia e sob as mesmas condições. A precisão intermediária foi avaliada analisando as amostras em triplicata em três dias diferentes. Para ambos os ensaios foi utilizado a formulação NEOA<sub>(8%, 0,01 mM)</sub>, de modo a obter uma concentração teórica de 3,0 (µg/mL). O método foi considerado preciso quando os valores de desvio padrão relativo (DPR) forem menores que 5% (BRASIL, 2012).

### 2.3.3.2.5 Exatidão

Uma alíquota de uma nanoemulsão catiônica (NEOA<sub>(8%, 0,01 mM)</sub>), contendo uma quantidade equivalente a 1,5 mg de ácido elágico foi adicionado a um balão volumétrico de 50,0 mL e o volume completado com metanol (Solução S1). Alíquotas desta solução foram transferidas para balões volumétricos de 10,0 mL e, em seguida, uma alíquota de uma solução padrão de ácido elágico a 100 µg/mL foi adicionada a cada

um dos balões de modo a obter concentrações teóricas finais de 2,0, 4,0 e 7,0  $\mu\text{g/mL}$  (Tabela 2.1). Após, 2,0 mL da solução de borato de sódio/HCl 0,05 mol/pH 7,0 e 1,0 mL da solução de CTAB 0,05 mol/L foram adicionados e o volume final foi completado com metanol. As soluções resultantes foram analisadas por espectrofluorimetria conforme descrito em 2.3.3.1. As análises foram realizadas em triplicata. A exatidão foi calculada como sendo a percentagem de fármaco recuperado em cada amostra. O método é considerado exato quando valores de recuperação entre 90 e 110% são obtidos.

**Tabela 2.1:** Diluições realizadas para o ensaio de exatidão onde com a nanoemulsão catiônica  $\text{NEOA}_{(8\%, 0,01 \text{ mM})}$ .

Balão	Volume (mL) da solução S1 (30 $\mu\text{g/mL}$ )	Volume (mL) da solução padrão (100 $\mu\text{g/mL}$ )	Conc.teórica de padrão adicionada ( $\mu\text{g/mL}$ )	Conc. Total ( $\mu\text{g/mL}$ )
1	0,34	0,1	1,0	2,0
2	0,34	0,3	3,0	4,0
3	0,34	0,6	6,0	7,0
4	0,34	-	-	1,0
5	-	0,3	3,0	3,0

### 2.3.3.2.6 Robustez

Para avaliação da robustez, uma alíquota de uma formulação de nanoemulsão catiônica ( $\text{NOA}_{(8\%, 0,01 \text{ mM})}$ ) foi transferida para um balão volumétrico de 10 mL de modo a obter uma solução com concentração final de 3,0  $\mu\text{g/mL}$ . Em seguida, 2,0 mL da solução de borato de sódio/HCl 0,05 mol/pH 7,0 e 1,0 mL da solução de CTAB foram adicionados e o volume final foi completado com metanol. Esta solução foi analisada por espectrofotometria de fluorescência, conforme descrito em 2.3.3.1, alterando os parâmetros conforme mostrado na Tabela 2.2. As análises foram realizadas em sextuplicata. Os resultados foram avaliados quanto ao teor de fármaco encontrado.

**Tabela 2.2:** Parâmetros de robustez avaliados para a validação do método espectrofluorimétrico para determinação do ácido elágico nas nanoemulsões catiônicas por espectrofluorimetria.

Parâmetro	Nível Inferior	Nível Superior
Comprimento de onda de excitação (nm)	386	390
Concentração de CTAB (mol/L)	0,04	0,06
Tempo de reação (minutos)	35	45

### 2.3.3.3 Determinação do teor e da eficiência de encapsulação

Para avaliação do teor de AE, uma alíquota de 2,5 mL de cada uma das formulações de NE foi transferida para balões volumétricos de 25,0 mL e o volume foi completado com metanol e homogeneizado. Em seguida, 1,0 mL das soluções anteriores foram transferidas para balões volumétricos de 10,0 mL, juntamente com 2,0 mL de uma solução tampão de borato de sódio/HCl 0,05 mol/L pH 7,0 e 1,0 mL de solução aquosa de cetiltrimetilamônio (CTAB, 0,05 mol/L). O volume final foi completado com metanol e as soluções foram homogeneizadas. As soluções foram mantidas em repouso por 40 minutos e após foi feita a leitura por espectrofotometria de fluorescência. O teor de fármaco nas formulações foi expresso em mg/mL.

A eficiência de encapsulação do AE foi estimada como sendo a diferença percentual entre a concentração total do fármaco das dispersões, determinada após completa dissolução das partículas em metanol, e aquela encontrada no sobrenadante obtido após ultrafiltração/centrifugação das amostras a 2500 rpm durante 30 minutos, em unidades Microcon com membrana Ultracel YM-100 (100.000 NMWL, Millipore, EUA). A recuperação (%) de AE nas formulações foi calculada correlacionando a quantidade total de fármaco nas formulações com a quantidade inicialmente adicionada. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

### 2.3.4 Avaliação de atividade antioxidante *in vitro*

A atividade antioxidante das nanoemulsões catiônicas contendo ácido elágico foi avaliada pelo método do DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil), conforme metodologia adaptada de Kim e colaboradores (2002). Inicialmente, 5 mg de DPPH foram dissolvidos em metanol em um balão volumétrico de 50 mL, e o volume completado com o mesmo solvente. Esta solução foi diluída de modo a obter soluções metanólicas de DPPH nas concentrações de 10, 20, 30, 40, 50 e 60  $\mu\text{M}$ . As soluções foram então lidas em espectrofotômetro no comprimento de onda de 515 nm. A partir dos valores de concentração de DPPH obtidos *versus* absorvância uma curva analítica foi construída e a equação da reta e coeficiente de regressão linear ( $R^2$ ) foram determinados. Para determinação da atividade antioxidante das formulações, o ácido elágico livre e as nanoemulsões catiônicas contendo ácido elágico foram diluídas em metanol de modo a obter soluções na concentração de 1,6; 3,3; 4,5; 6,6; 8,2; 9,9; 13,2; 16,5; 19,9 e 23,1  $\mu\text{M}$ . Uma alíquota de 2,0 mL de cada uma das soluções foi transferida para tubos de ensaio e, em seguida, 1,0 mL da solução de DPPH 0,1 mg/mL foi adicionado em cada tubo. As soluções foram incubadas por 30 minutos ao abrigo da luz e, em seguida, lidas em espectrofotômetro a 515 nm. A concentração remanescente de DPPH foi determinada a partir da curva de calibração. A partir dos resultados, curvas de DPPH remanescente (%) *versus* concentração da amostra ( $\mu\text{M}$ ) foram construídas e a partir da porção linear da curva, a quantidade de antioxidante necessária para decrescer a concentração inicial de DPPH em 50% ( $CA_{50}$ ) foi determinada. Todas as análises foram realizadas em triplicata. As concentrações de ( $CA_{50}$ ) foram analisadas estatisticamente pela Análise de Variância (ANOVA) de duas vias, seguida do teste de Tukey ( $p > 0,05$ ).

### 2.3.5 Avaliação das interações entre a mucina e as nanoemulsões catiônicas

Uma dispersão de mucina submaxilar bovina (Sigma-Aldrich, EUA) foi preparada em tampão acetato pH 6 na concentração de 250  $\mu\text{g/mL}$ . As nanoemulsões catiônicas foram adicionadas à dispersão de mucina em diferentes concentrações (0,5; 1; 3 e 6%, v/v). As

dispersões resultantes foram avaliadas quanto ao tamanho e potencial zeta por espectroscopia de correlação fotônica e anemometria laser-Doppler, respectivamente, utilizando o Zetasizer Nano Series (Mavern Instruments, Worcestershire, UK), conforme descrito em 2.3.2.1.

## **2.3.6 Estudos de permeação nasal in vitro**

### **2.3.6.1 Preparação das membranas para ensaio de permeação**

Estudos de permeação nasal do ácido elágico foram realizados em modelo bicompartimental de células de Franz com área de interface de 2,27cm<sup>2</sup> e volume interno de 11 mL. A mucosa olfatória suína foi utilizada como modelo de membrana (KANDIMALLA, DONOVAN, 2005) e foram obtidas de abatedouro localizado em Antônio Carlos (Santa Catarina). Para os ensaios, a mucosa fresca foi removida com auxílio de pinça e tesoura cirúrgica e mantida em banho de gelo, imersa em solução salina até o momento do experimento. As mucosas foram utilizadas até 5 horas após o abate dos animais. Cortes do tecido fresco foram então colocados nas células de Franz entre os compartimentos doador e receptor, e deixados equilibrar durante 30 minutos com o meio acceptor.

### **2.3.6.2 Cinética de permeação**

Os ensaios de permeação nasal foram realizados utilizando uma solução de tampão fosfato pH 6,4 e polietilenoglicol 400 (60:40, m/m) como meio acceptor. Antes dos experimentos, o equivalente a 80 µg de AE (aproximadamente 300 µL das nanoemulsões) foram aplicados sobre a superfície da mucosa nasal. As células foram mantidas a 37 ° C ± 1 ° C, por um período de 12 horas. Após o início da cinética de permeação, alíquotas de 0,8 mL do meio acceptor foram coletadas em diferentes intervalos de tempo, para posterior quantificação do ácido elágico por cromatografia líquida de alta eficiência, conforme descrito em 2.3.6.3.1. O volume do meio receptor removido em cada amostragem foi repostado de modo a manter as condições *sink*. Nanoemulsões catiônicas isentas de fármaco foram testadas nas mesmas condições para serem utilizadas como referência na validação do método analítico. Após o estudo de permeação, as mucosas nasais

suínas foram removidas das células de difusão, picotadas, transferidas para balões volumétricos de 10,0 mL e submetidas à extração *overnight* com metanol. As amostras foram filtradas e quantificadas por CLAE conforme descrito em 2.3.6.3.1, e os resultados foram expressos em  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ .

### **2.3.6.3 Determinação do ácido elágico permeado e retido na mucosa nasal por cromatografia líquida de alta eficiência**

#### **2.3.6.3.1 Condições cromatográficas**

As análises foram realizadas em cromatógrafo Perkin Elmer 200 series (USA) equipado com uma bomba series 200, degaseificador series 200, detector series 200 e sistema controlador series 600. Os experimentos foram realizados utilizando coluna C18 Luna (250 mm x 4.6 mm, 5  $\mu\text{m}$  de tamanho de partícula, Phenomenex), conectada a uma pré-coluna RP18 (3 cm x 4 cm, Phenomenex). O método de quantificação do AE foi adaptado de Sonaje e colaboradores (2007) e a fase móvel foi constituída de uma mistura de acetonitrila e água acidificada (ácido acético 1%) 22:78 (V/V), fluxo de 1,0 mL/min, em modo isocrático e volume de injeção de 20  $\mu\text{L}$ . O ácido elágico foi detectado em comprimento de onda de 255 nm e as áreas dos picos obtidas foram integradas usando o Software Total Chron Workstation V 6.3.1.

Para quantificação do AE permeado e retido na mucosa nasal, a metodologia analítica foi validada quanto aos parâmetros de especificidade, linearidade, limites de detecção e quantificação, precisão e exatidão (BRASIL, 2012).

#### **2.3.6.3.2 Validação da metodologia analítica**

##### **2.3.6.3.2.1 Especificidade**

A especificidade do método de quantificação do AE foi avaliada por meio da análise do meio aceptor contendo nanoemulsão catiônica branca ( $\text{NE}_{\text{OA}}$  4%, 0,05 mM) e das soluções obtidas após extração do AE com metanol a partir das mucosas nasais, após 12 horas de ensaio de permeação, usando a mesma nanoemulsão catiônica branca. A especificidade foi verificada pela comparação dos cromatogramas

obtidos com aquele obtido para uma solução padrão de ácido elágico 1,0 µg/mL no meio acceptor e em metanol.

### 2.3.6.3.2.2 Linearidade e determinação dos limites de detecção e quantificação

Para avaliação da linearidade do método, uma solução estoque de AE 0,1 mg/mL foi preparada usando metanol como solvente. Esta solução foi então diluída com o meio receptor (tampão fosfato pH 6,4: PEG 400; 60:40), de modo a obter soluções padrões na faixa de concentração de 0,1 a 10,0 µg/mL. Gráficos de concentração *versus* área foram construídos e os respectivos coeficientes de correlação ( $r^2$ ) e equações da reta foram obtidos pelo método dos mínimos quadrados. As análises foram realizadas em triplicata. Três curvas de calibração foram obtidas em três dias diferentes. Os critérios de aceitação foram:  $r^2 \geq 0,99$ , inclinação e y-intercepto com desvio padrão relativo (DPR)  $\leq 20\%$  (BRASIL, 2012).

Os limites de quantificação (LQ) e detecção (LD) do método foram calculados utilizando as seguintes equações:

$$LQ = \frac{10\sigma}{s} \qquad LD = \frac{3,3\sigma}{s}$$

Onde:

$\sigma$  é o desvio padrão do intercepto com o eixo do Y obtidos a partir de três curvas de calibração e  $s$  é a inclinação da curva de calibração.

### 2.3.6.3.2.3 Precisão

A precisão do método foi determinada pelos ensaios de repetibilidade (intradia) e de precisão intermediária (interdia), após 12 horas de ensaio de permeação com  $NE_{OA(4\%, 0,05 \text{ mM})}$  isentas de ácido elágico. A repetibilidade foi determinada por meio da análise das soluções obtidas após a extração da mucosa e do meio acceptor, contaminados com AE padrão nas concentrações de 0,5 µg/mL, 0,8 µg/mL e 3,0 µg/mL, em triplicata, e no mesmo dia. Para a análise da precisão intermediária, o meio acceptor e o extrator foram contaminados

com AE de modo a obter concentrações de 0,5 µg/mL, 0,8 µg/mL e 3,0 µg/mL, e analisados em três dias distintos em triplicata.

#### **2.3.6.3.2.4 Exatidão**

A exatidão do método foi avaliada após contaminação do meio acceptor obtido após 12 horas de ensaio de permeação com NE<sub>OA</sub>(4%, 0,05 mM) isentas de ácido elágico, e da solução resultante da extração da mucosa com uma solução padrão de AE 100 µg/mL, de modo a obter concentrações de 1,0 µg/mL (baixa), 1,5 µg/mL (média) e 3,0 µg/mL (alta). A exatidão foi calculada como a porcentagem de fármaco recuperada em cada amostra, sendo o método considerado exato com valores de recuperação entre 90 e 110 % (BRASIL, 2012). A análises foram realizadas em triplicata.

#### **2.3.6.3.2.5 Análise estatística**

Os resultados de quantidade de AE permeada e retida na mucosa foram analisadas estatisticamente pela Análise de Variância (ANOVA), seguido do teste de Tukey ( $p > 0,05$ ).

## 2.4 Resultados e discussão

### 2.4.1 Preparação e caracterização das nanoemulsões catiônicas

O preparo de nanoemulsões pela técnica da emulsificação espontânea consiste em, primeiramente, preparar uma solução composta de óleo, tensoativo lipofílico e um solvente orgânico miscível em água. A fase aquosa é formada por água e um tensoativo hidrofílico. A fase orgânica é, então, adicionada na fase aquosa sob agitação magnética. Utilizando esta técnica, uma emulsão submicrométrica óleo em água (O/A) é formada instantaneamente com a rápida difusão do solvente orgânico na fase externa aquosa. A agitação magnética é mantida durante mais algum tempo para permitir que o sistema atinja o equilíbrio (BOUCHEMAL et al., 2004). Para a obtenção das nanoemulsões, estudos iniciais foram realizados, testando-se diferentes componentes de formulação, tais como tipo e concentração de tensoativo hidrofílico e lipofílico, tipo e concentração de óleo e tipo e concentração de lipídeo catiônico. Como tensoativos hidrofílicos, o Pluronic F68, Solutol HS15 e o Tween 80 foram testados, entretanto, sistemas nanoemulsionados visualmente homogêneos foram obtidos na ausência dos mesmos, optando-se por retirá-los das formulações. Visto que autores descrevem a utilização de somente um tensoativo lipofílico para obtenção de nanoemulsões estáveis (MARTINI et al., 2008), aliado ao fato de alguns tensoativos serem irritantes às mucosas (EKELUND et al., 2005; CSÁKI, 2011), a ausência deste tipo de adjuvante parece ser uma característica interessante da formulação. Com relação ao tensoativo lipofílico, a lecitina de soja (Lipoid S100, 100% fosfatidilcolina) foi testada em três concentrações distintas 0,34%; 0,5% e 1% (m/m). As formulações contendo maiores quantidades de tensoativo lipofílico propiciaram duas ou mais populações de tamanho de partícula, com índices de polidispersão maiores que 0,5 (dados não mostrados), sendo, portanto, descartadas. As nanoemulsões obtidas com 0,34% de lecitina de soja apresentaram características físico-químicas adequadas, e esta concentração foi mantida nos estudos de formulação.

Assim, tendo estabelecido o tipo e concentração de tensoativo, o tipo e concentração de óleo foi avaliado. Os óleos foram analisados

quanto à solubilidade do AE, que foi quantificado por espectrofotometria de absorção no ultravioleta, em comprimento de onda de 315 nm. As solubilidades encontradas foram de 0,3 mg/mL para o óleo de rícino, 0,2 mg/mL para o óleo de girassol e 0,75 mg/mL para o óleo triglicéridos de cadeia média (TCM), sendo este último selecionado, devido a sua maior capacidade de solubilizar o AE. Formulações de nanoemulsões isentas de AE foram desenvolvidas empregando-se duas concentrações de TCM (4,0% e 8,0%, m/m) e dois tipos de lipídeo catiônico, oleilamina (OA) e estearilamina (EA), em concentrações de 0 a 2 mM. O lipídeo catiônico foi utilizado com intuito de oferecer propriedades mucoadesivas às nanoemulsões, uma vez que a carga positiva da gotícula poderia interagir, por meio de interações eletrostáticas, com a carga negativa da mucina, a proteína presente no muco que reveste as mucosas (ANDREWS, LAVERTY, JONES, 2009). A composição final das formulações pode ser visualizada na Tabela 2.1 e a Figura 2.3 demonstra as propriedades de tamanho de gotícula e potencial zeta das nanoemulsões, em função da sua composição.

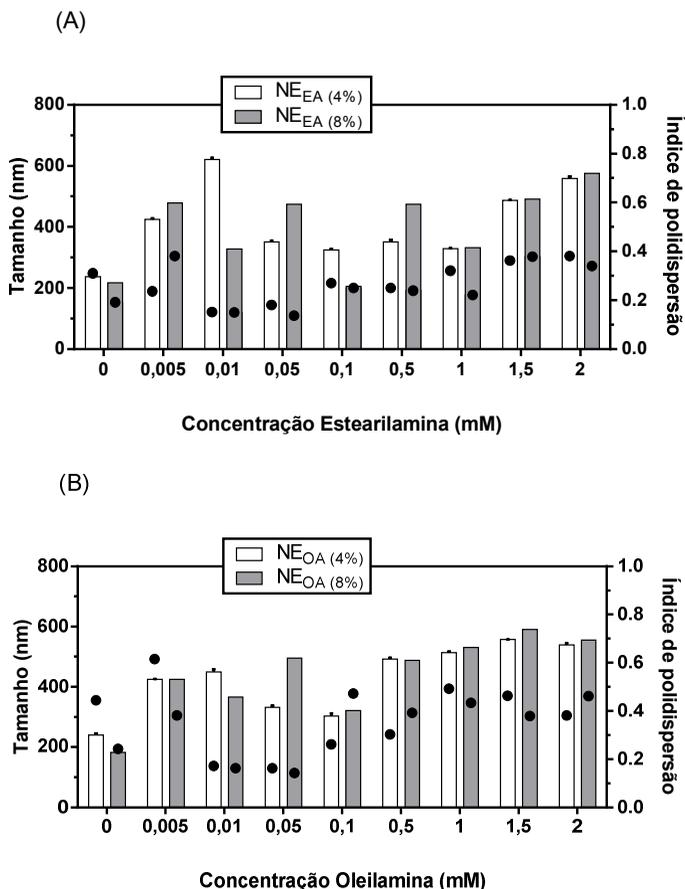
**Tabela 2.3:** Composição das formulações de nanoemulsões catiônicas.

	Esterilamina $NE_{EA}$ (x%, y mM) <sup>c</sup>	Oleilamina $NE_{OA}$ (x%, y mM) <sup>c</sup>
TCM <sup>a</sup> (% , m/V)	4 ou 8	4 ou 8
Lecitina de soja (% , m/V)	0,34	0,34
Estearilamina (mM)	0 a 2	-
Oleilamina (mM)	-	0 a 2
Ácido elágico (mg)	5 <sup>b</sup>	5 <sup>b</sup>
Glicerina (% , mV)	2,5	2,5
Água qsp (mL)	10	10

<sup>a</sup>TCM: triglicéridos de cadeia média.

<sup>b</sup>Quantidade de ácido elágico inicialmente empregada nas formulações.

<sup>c</sup> $N_{EA}$  e  $N_{OA}$  referem-se às nanoemulsões preparadas com estearilamina e oleilamina, respectivamente; “x %” designa a concentração de TCM e “y mM” designa a concentração de lipídeo catiônico.



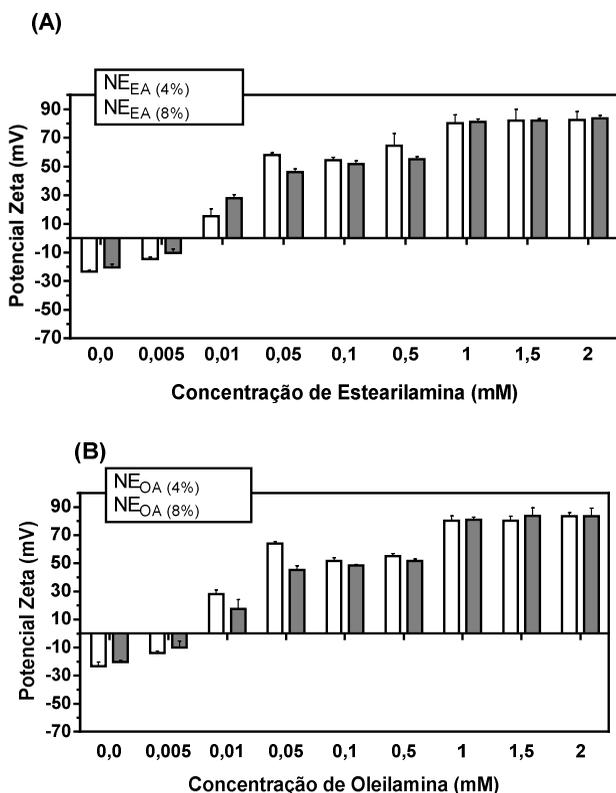
**Figura 2.1:** Efeito da concentração de TCM, do tipo e concentração do lipídeo catiônico sobre o tamanho médio das gotículas nas nanoemulsões isentas de fármaco. (A) Nanoemulsões preparadas com estearilamina, (B) nanoemulsões preparadas com oleilamina. Barras pretas: 4% de TCM. Barras brancas: 8% (m/m) de TCM. (●) Índice de polidispersão.

O tamanho das gotículas das nanoemulsões brancas variou de 216 a 621 nm para as nanoemulsões preparadas com estearilamina (NE<sub>EA</sub>), e de 182 a 530 nm para as nanoemulsões preparadas com oleilamina (NE<sub>OA</sub>). Como pode ser observado na Figura 2.1, o tamanho

das gotículas foi afetado pela concentração de lipídeo catiônico. Na ausência deste, as nanoemulsões apresentaram tamanhos menores que 250 nm. O tamanho pareceu aumentar até uma dada concentração de lipídeo catiônico (até 0,1 mM), sendo reduzido novamente. Tamanhos maiores também foram obtidos nas concentrações de 1,5 e 2 mM de EA e OA. Na ausência do lipídeo catiônico, as nanoemulsões são estabilizadas unicamente pela presença da lecitina de soja. Entretanto, quando o lipídeo catiônico é adicionado, este tende a neutralizar a carga superficial da lecitina de soja, o que provavelmente provocou o aumento do tamanho da gota. Em concentrações maiores e pelo lipídeo catiônico apresentar propriedades tensoativas, ocorreu a redução do tamanho das gotículas. Entretanto, parece existir uma concentração ótima de lipídeo catiônico, que permite a obtenção de nanoemulsões de tamanho reduzido e monodispersas, visto que aumentos subsequentes na concentração de EA ou AO levaram ao aumento do diâmetro médio e do índice de polidispersão. Os valores de índice de polidispersão variaram de 0,132 a 0,941, sendo que valores menores foram obtidos quando utilizadas concentrações de 0,01 e 0,05 mM nos dois lipídeos catiônicos.

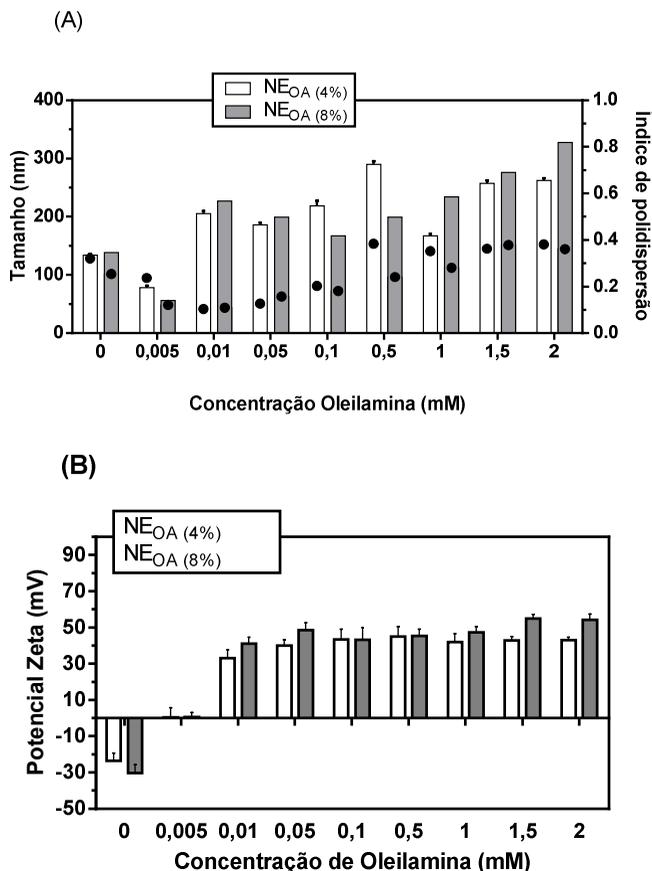
O potencial zeta é resultante do balanço de cargas de moléculas presentes na interface das nanoemulsões, seja dos tensoativos, seja de outros compostos que se encontram adsorvidos às mesmas. Em especial, os tensoativos, além de propiciarem uma estabilidade mecânica, também são capazes de produzir uma barreira eletrostática interfacial. Portanto, valores de potencial zeta maiores que 30 mV, em módulo, são desejáveis para a estabilidade físico-química das nanoemulsões, uma vez que a repulsão eletrostática tende a evitar possíveis agregações da fase interna (KLANG, BENITA, 1998). Os valores de potencial zeta das nanoemulsões são mostrados na Figura 2.2, e variaram entre -23,36 mV e +83,67 mV, dependendo da formulação analisada. Para as nanoemulsões preparadas na ausência de lipídeo catiônico e na concentração de 0,005 mM de EA ou OA, a carga superficial das gotículas foi negativa, podendo esta ser atribuída à presença da lecitina na interface, visto que em sua composição existe uma pequena percentagem de lipídeos carregados negativamente, principalmente de ácido fosfatídico (XU et al., 2013). Com o aumento na concentração de EA e OA, nas duas concentrações de óleo (TCM), a carga superficial das gotículas tornou-se positiva, sendo observado um crescente aumento nos valores até o alcance de um platô, a partir da concentração de 1 mM, sugerindo que a saturação da interface com lipídeo catiônico ocorreu

nesta concentração. A alteração da carga negativa das nanoemulsões estabilizadas com lecitina para positiva, com a adição de EA às formulações, também foi relatada por Martini e colaboradores (2007), em um estudo que visava associar oligonucleotídeos antisense, por meio de interações eletrostáticas com o lipídeo catiônico. Outros autores também descreveram a formação de platô nos valores de potencial zeta de nanoemulsões catiônicas, preparadas com concentrações elevadas de EA (SILVA et al., 2006) e OA (RABINOVICH-GUILATTA et al., 2004; MARTINI et al., 2008).



**Figura 2.2:** Efeito da concentração de TCM e do tipo e concentração do lipídeo catiônico sobre o potencial zeta nanoemulsões brancas (sem fármaco). (A) Nanoemulsões preparadas com estearilamina, (B) nanoemulsões preparadas com oleilamina. Barras pretas: 4% (m/m) de TCM. Barras brancas: 8% de TCM.

O ácido elágico é um polifenol que apresenta baixa solubilidade aquosa e em muitos solventes orgânicos, sendo que em etanol, o solvente da fase orgânica, a sua solubilidade é de apenas cerca de 0,1 mg/mL (BALA et al., 2006). Por esta razão, ele foi adicionado diretamente na fase orgânica da formulação contendo TCM, OA ou EA, lecitina e etanol. Este procedimento permitiu a incorporação de 5 mg do fármaco nas formulações. Tendo em vista que as nanoemulsões foram concentradas para 10 mL, a concentração final teórica de fármaco nas mesmas seria 0,5 mg/mL. Diferenças na solubilidade do AE na fase orgânica não foram verificadas com o tipo de lipídeo catiônico utilizado (EA ou OA). Assim, como a OA se apresenta como um líquido em temperatura ambiente, de mais fácil manuseio, este lipídeo catiônico foi selecionado para a continuação dos estudos de formulação. O tamanho das gotículas e o potencial zeta das nanoemulsões catiônicas contendo ácido elágico, em função da concentração de óleo (4 ou 8%, m/m) e da concentração de oleilamina são apresentados na Figura 2.3.

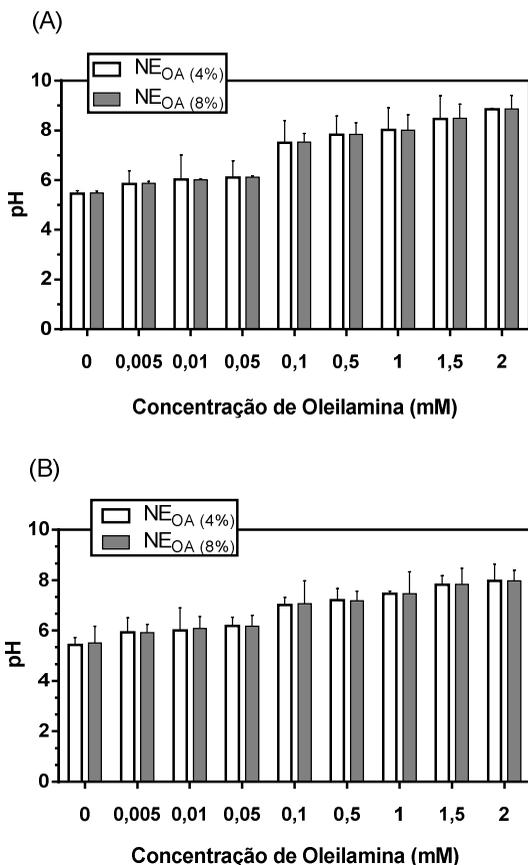


**Figura 2.3:** Efeito da concentração de TCM e da concentração de oleilamina sobre (A) tamanho médio e (B) potencial zeta das nanoemulsões contendo ácido elágico. (●) Índice de polidispersão.

A adição de ácido elágico levou à diminuição no tamanho médio das gotículas (Figura 2.3A), os quais variaram de 56 nm a 328 nm, com índices de polidispersão menores que 0,281. Estes resultados estão de acordo com outros autores que também desenvolveram nanoemulsões catiônicas utilizando a técnica de emulsificação espontânea (TRIMAILLE et al., 2003; SILVA et al., 2006). Os valores de potencial zeta das nanoemulsões também foram reduzidos com a

adição de AE variando entre -23,40 mV e 54,23 mV (Figura 2.3B). Para a formulação isenta de OA o valor de potencial zeta foi negativo, devido à presença de lipídeos carregados negativamente na lecitina, como discutido anteriormente (KLANG, BENITA, 1998). Quando a menor concentração de AO foi empregada (0,005 mM), o potencial zeta foi próximo de zero, o que comprometeu a estabilidade da formulação. A carga positiva das formulações foi verificada a partir da concentração de 0,01 mM de AO, ocorrendo também a formação de um platô.

A redução nos valores de potencial zeta das nanoemulsões após a adição de AE sugere que este polifenol interage com o lipídeo catiônico, neutralizando parcialmente a carga superficial das gotículas. Este resultado pode estar relacionado ao pH das formulações (Figura 2.4). Para estas formulações, um aumento progressivo dos valores de pH até cerca de 9 foi observado com a adição crescente do lipídeo catiônico, indicando o efeito do grupamento amina primária sobre esse parâmetro, efeito este que também foi descrito por Martini e colaboradores (2007). Para as nanoemulsões contendo ácido elágico, uma diminuição discreta nos valores pH foi verificada para concentrações de OA maiores que 0,1 mM. Um estudo do efeito do pH sobre a ionização do AE mostrou que este polifenol apresenta dois valores de pKa cineticamente significantes, 6,3 (pKa<sub>1</sub>) e 11,2 (pKa<sub>2</sub>) (MUÑOZ-MUÑOZ et al., 2009). Assim, com o aumento do pH ocorre o aumento no grau de ionização dos grupamentos hidroxila do AE, afetando as cargas positivas do lipídeo catiônico, nas nanoemulsões. Tendo em vista que o pH da mucosa nasal é de 5,5 a 6,5, as formulações foram ajustadas a pH 6,0 para os estudos posteriores.



**Figura 2.4:** Caracterização das nanoemulsões quanto ao pH, isentas de fármaco (A) e contendo AE (B) em dois níveis de concentração de TCM.

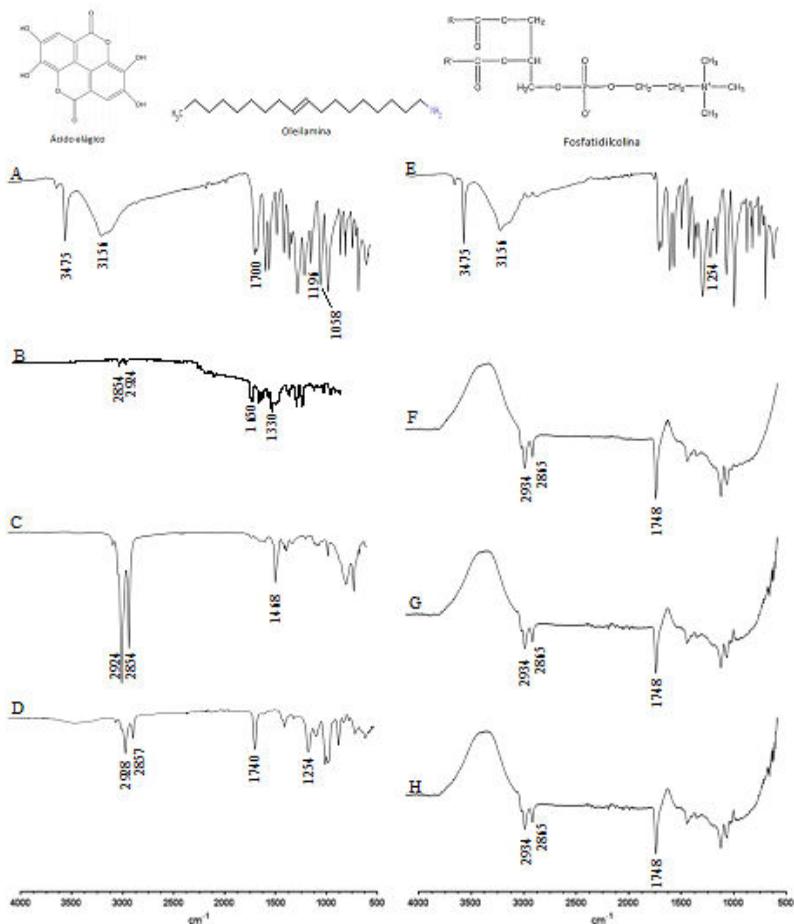
#### 2.4.2 Espectroscopia de Absorção no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

A espectroscopia FTIR tem sido usada com frequência na caracterização de formulações, com o intuito de verificar a existência de interações entre os componentes das mesmas. Neste trabalho, os

resultados de potencial zeta das nanoemulsões catiônicas sugeriram que este polifenol interage com a OA por meio de interações eletrostáticas, provocando a redução destes valores. Assim, com o objetivo de comprovar a existência dessas interações, espectros de FTIR dos componentes puros, de misturas físicas e das nanoemulsões catiônicas foram obtidos. Esses espectros encontram-se mostrados na Figura 2.5.

O AE exibiu bandas características de sua estrutura química, como o estiramento O-H das hidroxilas fenólicas em  $3475\text{ cm}^{-1}$  e uma banda de absorção larga, atribuída ao estiramento C-H do anel aromático de  $3340$  a  $2943\text{ cm}^{-1}$ . A banda em  $1700\text{ cm}^{-1}$  corresponde ao estiramento C=O e as bandas em  $1196\text{ cm}^{-1}$  e  $1058\text{ cm}^{-1}$  correspondem ao estiramento C-O das ligações éster (Figura 2.5 A) (HUSSEIN et al., 2011). No espectro da OA é possível identificar as bandas características dos estiramentos assimétrico e simétrico dos grupamentos  $-\text{CH}_2$  em  $2924$  e  $2854\text{ cm}^{-1}$ , respectivamente, e bandas entre  $1330$  e  $1650\text{ cm}^{-1}$ , correspondente às deformações dos grupos  $-\text{NH}_2$  (Figura 2.5 B) (XU et al., 2009). Na mistura física OA/AE (1:1), é possível identificar as bandas referentes aos estiramentos assimétrico e simétrico dos grupamentos  $-\text{CH}_2$  em  $2924$  e  $2854\text{ cm}^{-1}$  da oleilamina. As bandas características do AE, correspondentes ao estiramento O-H do grupamento fenólico em  $3475\text{ cm}^{-1}$ , e a banda larga correspondente ao estiramento C-H do anel aromático entre  $3340$  e  $2943\text{ cm}^{-1}$ , não foram visualizadas neste espectro, indicando a existência de interações entre estes componentes (Figura 2.5 C). Para a lecitina (Lipoid S100<sup>®</sup>) foram observadas bandas em  $2928$  e  $2857\text{ cm}^{-1}$  referentes aos estiramentos assimétrico e simétrico dos grupamentos  $-\text{CH}_2$ , bandas em  $1740\text{ cm}^{-1}$  correspondente ao estiramento dos grupamentos C=O dos ácidos graxos, e em  $1254\text{ cm}^{-1}$  correspondentes ao grupamento fosfato presentes nessa molécula (Figura 2.5 D) (SONVICO et al., 2006). Quando a fosfatidilcolina foi misturada fisicamente ao AE, as bandas desses dois componentes foram observadas nesse espectro, evidenciando que não há interação entre eles (Figura 2.5 E). Finalmente, nos espectros obtidos a partir das nanoemulsões catiônicas são observadas bandas em  $2934\text{ cm}^{-1}$  e  $2865\text{ cm}^{-1}$ , referentes aos estiramentos dos grupos  $-\text{CH}_2$  da fosfatidilcolina, e em  $1748\text{ cm}^{-1}$ , que pode ser atribuída ao estiramento C=O da fosfatidilcolina, Este último pico foi deslocado em cerca de  $8\text{ cm}^{-1}$ , indicando que ocorreu algum tipo de interação na nanoemulsão. Entretanto, os picos do AE não foram detectados, talvez pela pequena

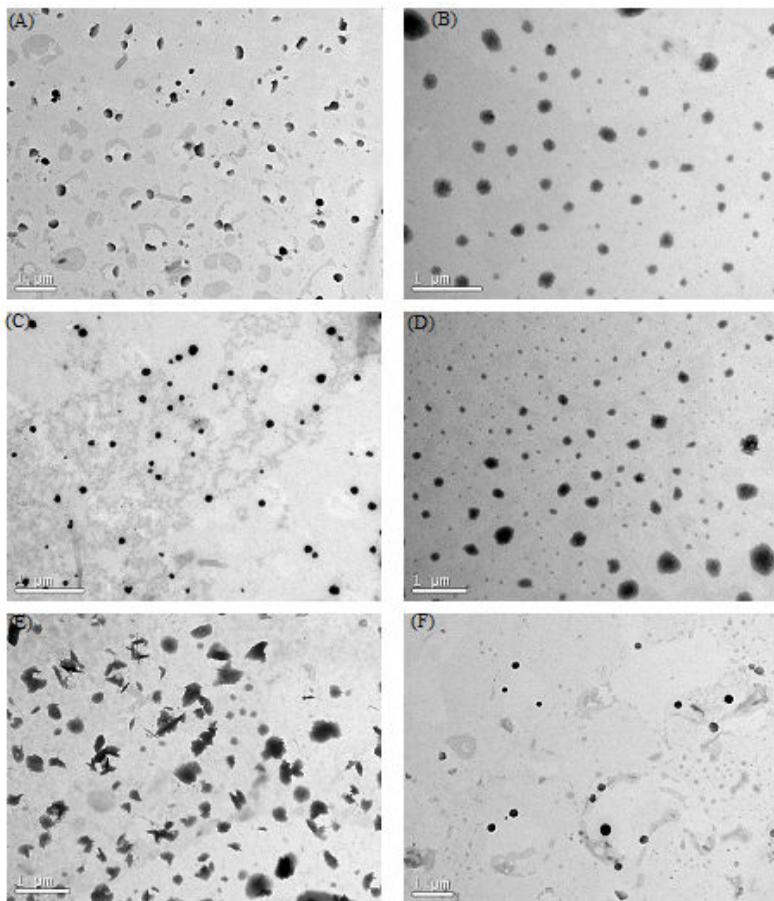
quantidade deste polifenol em relação aos outros componentes da formulação (Figuras 2.5 F a 2.5 H).



**Figura 2.5:** Estrutura química do ácido elágico, da fosfatidilcolina e oleilamina e espectros de FTIR para: (A) ácido elágico (AE), (B) oleilamina (OA), (C) mistura física AO/AE (1:1), (D) lecitina, (E) mistura física fosfatidilcolina/AE (1:1), (F) NE<sub>OA</sub>(4%,0 mM), (G) NE<sub>OA</sub>(4%,0,01 mM) e (H) NE<sub>OA</sub>(4%,0,05 mM).

### **2.4.3 Avaliação morfológica das nanoemulsões**

As fotomicrografias das nanoemulsões obtidas por microscopia eletrônica de transmissão (MET) podem ser visualizadas na Figura 2.6. Como pode ser observado as nanoemulsões preparadas com a menor concentração de óleo (4%) mostraram-se mais homogêneas e esféricas quando se comparadas àquelas contendo o dobro de TCM (8%). Este fator pode ser em decorrência da baixa concentração de tensoativo utilizada (0,34% de lecitina) que parece ter sido insuficiente para emulsionar completamente o sistema na concentração de TCM de 8%. Outro aspecto interessante observado nesta figura são as nanoemulsões isentas de lipídeo catiônico (Figura 2.6 E e 2.6 F), nestas emulsões mostraram-se menos homogêneas, mostrando que o lipídeo catiônico auxilia na emulsificação e na estabilidade do sistema desenvolvido.



**Figura 2.6:** Fotomicrografia obtidas por MET das nanoemulsões contendo ácido elágico, onde (A)  $NE_{OA(4\%, 0,05 \text{ mM})}$ , (B)  $NE_{OA(8\%, 0,05 \text{ mM})}$ , (C)  $NE_{OA(4\%, 0,01 \text{ mM})}$ , (D)  $NE_{OA(8\%, 0,01 \text{ mM})}$ , (E)  $NE_{(4\%, 0 \text{ mM})}$  e (F)  $NE_{(8\%, 0 \text{ mM})}$ , coradas com ácido fosfotúngstico.

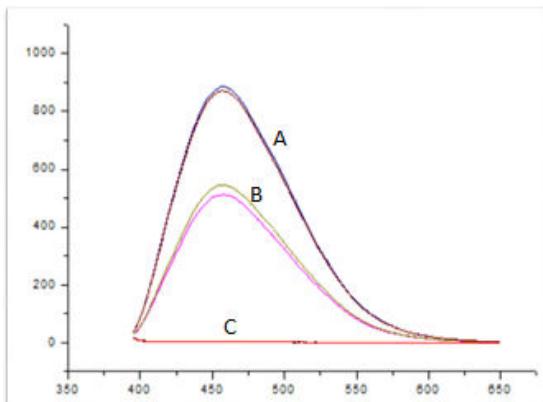
## **2.4.4 Determinação do teor e eficiência de encapsulação do ácido elágico nas nanoemulsões catiônicas**

O ácido elágico contido nas nanoemulsões catiônicas foi determinado por espectrofluorimetria, conforme descrito em 2.3.3.1. O ácido elágico é caracterizado por apresentar uma baixa fluorescência quando em solução aquosa, com máximo de emissão no comprimento de onda 450 nm. Wang e colaboradores (2011) mostraram que a intensidade de emissão fluorescência é aumentada na presença de borato de sódio e CTAB, com o máximo ocorrendo a 454 nm. Neste caso, um complexo entre o AE e borato de sódio é formado e este complexo é solubilizado no interior das micelas do surfactante. O efeito de solubilização micelar previne a colisão do complexo AE/borato de sódio com as moléculas de água, resultando em redução da perda de energia e aumentando o rendimento quântico de fluorescência. As condições utilizadas (borato de sódio/HCl 0,05 mol/L pH 7,0 e CTAB, 0,05 mol/L) foram aquelas otimizadas pelos autores. A metodologia de espectrofluorimetria usada neste trabalho para determinação do AE foi validada quanto aos parâmetros de especificidade, linearidade, precisão, exatidão e robustez. Os resultados são mostrados a seguir.

### **2.4.4.1 Validação da metodologia analítica**

#### **2.4.4.1.1 Especificidade**

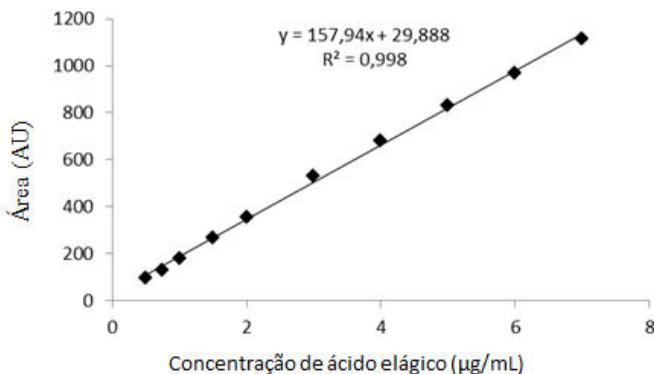
A especificidade é a capacidade de um método analítico em medir com exatidão a resposta de um composto de interesse na presença dos demais componentes da amostra (ICH, 2005). Para determinar a especificidade do método, os espectros de emissão obtidos após análise de uma solução padrão de ácido elágico 3,0 µg/mL em metanol, e das soluções obtidas após dissolução das nanoemulsões brancas e contendo ácido elágico no mesmo solvente foram comparados. Conforme mostrado na Figura 2.7, os constituintes da formulação não interferiram no espectro de emissão de fluorescência do ácido elágico, indicando que o método é específico nas condições testadas.



**Figura 2.7:** Espectros de fluorescência obtidos na análise da (A) solução padrão do ácido elágico 3,0  $\mu\text{g/mL}$ , (B) nanoemulsão contendo ácido elágico  $\text{NE}_{\text{AO}}$  (8%, 0,01 mM) (1,5  $\mu\text{g/mL}$ ); (C) nanoemulsão branca (com oleilamina ou estearilamina). As análises foram realizadas em comprimento de onda de excitação de 388 nm e emissão de 459 nm. Os slits de excitação e emissão dos monocromadores foram ajustados para 5 e 2,5 respectivamente.

#### 2.4.4.1.2 Linearidade

A linearidade do método foi testada no intervalo de concentração de 0,5 a 7,0  $\mu\text{g/mL}$ . Esta faixa de concentração foi selecionada visando obter um método com elevada sensibilidade, a fim de permitir a quantificação do ácido elágico em pequenas concentrações nos sistemas nanoemulsionados. A curva de calibração média obtida apresentou coeficiente de correlação de 0,998 e a equação da reta  $y = 157,54x + 29,888$ , onde  $y$  é a intensidade de fluorescência e  $x$  é a concentração de ácido elágico em  $\mu\text{g/mL}$  (Figura 2.8). Conforme estes resultados, o método fluorimétrico pode ser considerado linear na faixa de concentração testada (BRASIL, 2003).



**Figura 2.8:** Curva de calibração de ácido elágico obtida por espectroscopia de fluorescência, utilizando comprimento de onda de excitação de 388 nm e emissão de 459 nm. Os slits de excitação e emissão dos monocromadores foram ajustados para 5 e 2,5 respectivamente.

#### 2.4.4.1.3 Limite de quantificação (LQ) e detecção (LD)

O limite de detecção (LD) é definido como a menor quantidade do fármaco que pode ser detectada em uma amostra, porém não necessariamente quantificada como valor exato. O limite de quantificação (LQ) é definido como sendo a menor quantidade do fármaco em uma amostra capaz de ser quantitativamente determinada com precisão e exatidão (ICH, 2005). Os valores obtidos para LQ e LD, conforme equações descritas em 2.3.3.2.3, foram 0,153 µg/mL e 0,05 µg/mL, respectivamente. Estes valores indicam que o método é suficientemente sensível para quantificar o ácido elágico nas nanoemulsões.

#### 2.4.4.1.4 Precisão

O ensaio de precisão intradia (repetibilidade) foi realizado em sextuplicata durante o mesmo dia, pelo mesmo analista, e os resultados obtidos encontram-se na tabela 2.4. Para o ensaio de precisão intermediária (interdia), a formulação NOA<sub>(8%, 0,01 mM)</sub> foi analisada em sextuplicata em três dias diferentes, pelo mesmo analista, e os resultados

obtidos encontram-se na Tabela 2.4. Considerando que para ambos os casos os valores de desvio padrão relativo (DPR) foram menores que 5%, o método pode ser considerado preciso.

**Tabela 2.4:** Valores experimentais obtidos na avaliação precisão intradia e interdia do método.

Amostra	Concentração teórica de AE ( $\mu\text{g/mL}$ )	Média da concentração de AE ( $\mu\text{g/mL}$ )	Recuperação (%)	DPR (%)
NOA <sub>(8%, 0,01 mM)</sub>	3,00	3,01	99,54	1,32

Amostra	Dia	Concentração teórica de AE ( $\mu\text{g/mL}$ )	Média da concentração de AE ( $\mu\text{g/mL}$ )	Recuperação (%)	DPR (%)
NEOA <sub>(8%, 0,01 mM)</sub>	1	3,0	2,99	99,66	1,99
	2	3,0	2,98	99,33	1,95
	3	3,0	3,01	100,33	2,03

#### 2.4.4.1.5 Exatidão

A exatidão representa o grau de concordância entre os resultados individuais encontrados nas amostras em análise e um valor de referência aceito como verdadeiro (ICH, 2005). A exatidão foi então determinada por meio da análise em triplicata de uma amostra de NOA<sub>(8%, 0,01 mM)</sub>, contaminada com concentrações conhecidas ácido elágico em três níveis de concentração (baixo, médio e alto). O método mostrou-se exato, como mostra os valores de percentual de recuperação do analito na amostra testada (Tabela 2.5).

**Tabela 2.5:** Valores obtidos na avaliação da exatidão do método de análise do AE por espectrofluorimetria.

Nível de concentração	Concentração teórica de AE (µg/mL)	Concentração média obtida de AE (µg/mL)	Recuperação (%)	DPR (%)
Baixo	3,0	2,94	97,91	0,98
Médio	4,0	3,92	97,88	0,11
Alto	7,0	7,01	100,15	0,49

#### 2.4.4.1.6 Robustez

A robustez do método é a medida da sua capacidade em resistir a pequenas e deliberadas variações dos parâmetros analíticos, indicando sua confiança (BRASIL, 2003; ICH, 2005). Para avaliação da robustez do método espectrofluorimétrico, os valores de comprimento de onda de emissão, tempo de reação e concentração do CTAB foram alterados. A Tabela 2.6 exibe os valores de intensidade de fluorescência de excitação obtido após análise. Os valores de DPR (%) obtidos para os três parâmetros analíticos analisados foram menores que 5%, indicando que o método é robusto.

**Tabela 2.6:** Valores de intensidade de fluorescência de excitação obtidos na avaliação da robustez do método analítico.

Parâmetro avaliado		Intensidade de fluorescência	Valores médios de intensidade de fluorescência (DPR, %)
Comprimento de onda de excitação (nm)	386	575,56	575,32 (0,078)
	388	574,79	
	390	575,61	
Tempo de reação (min)	45	577,24	572,89 (0,99)
	40	577,37	
	50	564,07	
Concentração de CTAB (mM)	0,03	555,14	577,56 (3,90)
	0,05	577,37	
	0,07	600,19	

#### 2.4.4.2 Teor, eficiência de encapsulação e recuperação do ácido elálgico nas nanoemulsões

Após validação do método espectrofluorimétrico foi possível determinar o teor, a eficiência de encapsulação e recuperação do AE nas nanoemulsões. Os resultados encontram-se exibidos na Tabela 2.7. Como pode ser observado, o teor e, portanto, a recuperação de AE variou em função da quantidade de lipídeo catiônico presente na nanoemulsão. Na ausência e na mais baixa concentração de lipídeo catiônico (0,005 mM), baixos teores de AE foram obtidos. Os maiores valores foram obtidos para a faixa de concentração de OA de 0,01 a 0,5 mM. Para estas concentrações, o teor e a recuperação de AE variaram entre 0,27 e 0,36 mg/mL e entre 53,53% e 72,33%, respectivamente. Concentrações maiores que estas provocaram a redução do teor de AE nas formulações. Estes dados sugerem, primeiramente, que o lipídeo catiônico interfere na associação do AE. É possível que parte do AE associado às nanoemulsões encontre-se adsorvido na superfície das mesmas, por meio de interações eletrostáticas com a OA, corroborando com os resultados observados na determinação do potencial zeta. Por outro lado, em concentrações igual ou superior a 1 mM, ocorre a redução do teor de AE devido, provavelmente, à formação de agregados, os quais ficavam aderidos ao balão de evaporação e no filtro, durante a preparação das nanoemulsões. A nanoemulsão preparada com 4% (m/m)

de TCM e 0,05 mM de OA ( $NE_{OA(4\%, 0,05 \text{ mM})}$ ) apresentou teor de 0,36 mg/mL. Considerando que solubilidade do ácido elágico em tampão fosfato pH 6,4, previamente determinada conforme descrito em 2.3.3.1, é de cerca de 5  $\mu\text{g/mL}$ , a encapsulação do fármaco nas nanoemulsões aumentou a concentração de AE em cerca de 70 vezes, evidenciando o benefício da utilização destes carreadores na administração deste composto. Em relação à concentração de óleo (4 e 8%) os parâmetros de teor e recuperação se mantiveram semelhantes nas duas concentrações. A eficiência de encapsulação (EE, %), estimada como sendo a diferença entre a concentração total do fármaco e a concentração do fármaco no sobrenadante, variou entre 95,50% até 99,15%, indicando que a maior parte do fármaco encontra-se preferencialmente associado às gotículas.

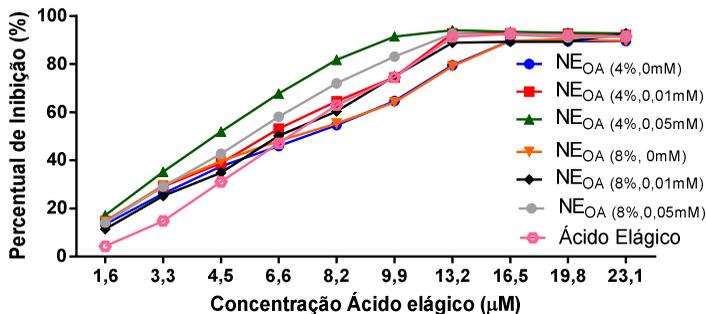
**Tabela 2.7:** Valores de teor (mg/mL), eficiência de encapsulação (EE, %) e recuperação (R, %) de ácido elágico nas nanoemulsões catiônicas em função da concentração de TCM e oleilamina.

[OA] (mM)	Concentração de TCM					
	TCM 4% (m/m)			TCM 8% (m/m)		
	Teor	EE (%)	R (%)	Teor	EE (%)	R (%)
0	0,13 ±	97,62 ±	25,80 ±	0,17 ±	98,23	34,60
	0,02	0,23	4,25	0,06	± 0,54	± 3,37
0,005	0,07 ±	95,50 ±	8,00 ±	0,08 ±	96,17	9,40 ±
	0,01	0,54	1,27	0,01	± 1,93	1,27
0,01	0,32 ±	99,00 ±	64,66±	0,30 ±	98,98	61,33
	0,01	0,43	4,45	0,09	± 1,03	± 1,97
0,05	0,36 ±	99,15 ±	72,33 ±	0,29 ±	98,93	57,40
	0,09	0,96	0,90	0,02	± 2,67	± 1,38
0,1	0,28 ±	98,90 ±	56,06 ±	0,30 ±	99,10	67,33
	0,03	0,98	7,08	0,02	± 1,97	± 4,11
0,5	0,29 ±	98,94 ±	57,33 ±	0,27±	98,86	53,53
	0,01	1,98	2,99	0,02	± 1,71	± 4,38
1,0	0,17 ±	98,20 ±	34,06 ±	0,21 ±	98,56	42,66
	0,09	2,8	2,93	0,03	± 3,89	± 6,64
1,5	0,16 ±	98,06 ±	31,66 ±	0,17 ±	98,16	33,40
	0,09	0,58	2,10	0,07	± 4,91	± 1,44
2,0	0,21 ±	98,59 ±	43,46 ±	0,20 ±	98,47	40,33
	0,02	1,28	1,30	0,04	± 5,58	± 0,83

Tendo em vista não somente os valores de teor do AE, mas também o fato de as formulações preparadas com 4% de TCM, com 0,01 e 0,05 mM de OA resultarem em nanoemulsoes catiônicas com características de tamanho, índice de polidispersão e potencial zeta adequadas, e aliado ao fato de serem as menores concentrações de lipídeo catiônico, estas formulações foram selecionadas para a continuidade do trabalho.

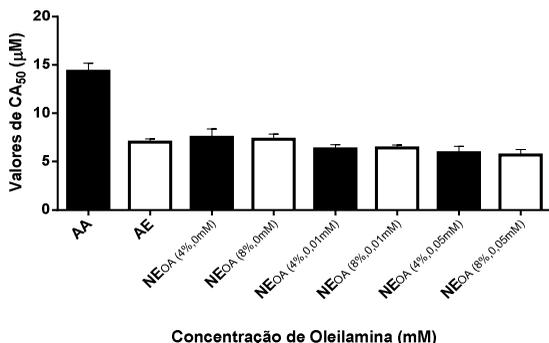
#### **2.4.5 Avaliação da atividade antioxidante do ácido elágico *in vitro* (DPPH)**

A capacidade antioxidante foi avaliada pelo método do DPPH. Este método é baseado na captura do radical livre estável 1,1-difenil-2-picril-hidrazil por substâncias capazes de doar prótons, levando à formação da sua forma reduzida (MOLYNEUX, 2004). À medida que o DPPH sofre redução, observa-se a mudança da coloração da solução original de violeta intensa para amarela, proporcional à concentração da substância antioxidante em questão (BLOIS, 1955). Para determinação da atividade antioxidante do ácido elágico, uma curva de concentração *versus* percentual de redução do DPPH foi construída na faixa de concentração de 1,6 a 23,1  $\mu\text{M}$ , usando tanto o ácido elágico livre como na forma nanoemulsionada (Figura 2.9). A porção linear das curvas obtidas foi utilizada para determinação da  $CA_{50}$  (concentração que leva à redução de 50% do DPPH). A partir da concentração de 13,2  $\mu\text{M}$  de ácido elágico foi verificada a formação de um platô, indicando que ocorreu a completa redução das espécies radiculares de DPPH pelo ácido elágico.



**Figura 2.9:** Avaliação da capacidade antioxidante do ácido elágico isolado e nas nanoemulsões em função do percentual de inibição de formação do radical DPPH.

Os valores médios das concentrações antioxidantes de 50% das espécies radicalares ( $CA_{50}$ ) foram de  $7,0 \mu\text{M}$  para o AE puro e de  $6,3 \text{ mM}$  a  $7,5 \text{ mM}$  para as nanoemulsões catiônicas contendo ácido elágico, sendo que não houve diferença significativa entre estes valores ( $p > 0,05$ ) (Figura 2.10). Estes resultados indicaram que a técnica de obtenção das nanoemulsões catiônicas não alterou a potência antioxidante do ácido elágico. Como um controle positivo do teste de atividade antioxidante foi empregado o ácido ascórbico, que apresentou  $CA_{50}$  de  $14,32 \mu\text{M}$ . Este resultado demonstrou que o AE apresenta uma potência antioxidante duas vezes maior que o ácido ascórbico. Nanoemulsões catiônicas isentas de fármaco também foram avaliadas e não apresentaram diferença nos valores de absorvância no comprimento de onda de absorção do radical DPPH ( $515 \text{ nm}$ ). O valor de  $CA_{50}$  obtido para o ácido ascórbico foi de aproximadamente a metade do apresentado por Kim e colaboradores (2002). Isto pode ser devido ao teste de DPPH ser muito sensível, podendo ocorrer inúmeras interferências quanto à concentração do radical, solvente utilizado, comprimento de onda e diferentes espectrofotômetros (DAWIDOWICZ, WIANOWSKA, OLSZOWY, 2012).



**Figura 2.10:** Valores de CA<sub>50</sub> (concentração de antioxidante capaz de inibir a formação do radical DPPH em 50%) obtidos para o ácido ascórbico (AA), ácido elágico (AE) e para as nanoemulsões catiônicas contendo ácido elágico preparadas em diferentes concentrações de oleilamina.

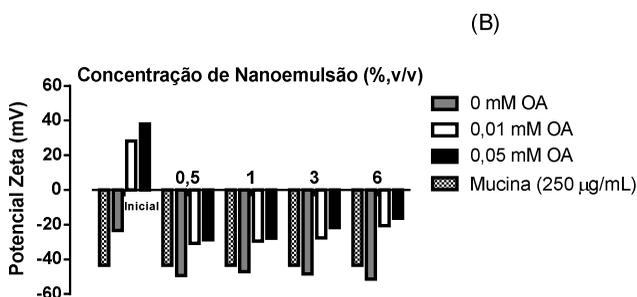
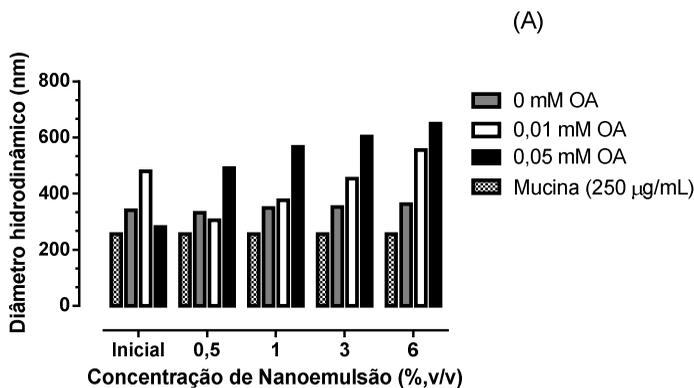
Os resultados obtidos na avaliação da atividade antioxidante do ácido elágico *in vitro* indicaram que a técnica de obtenção das nanoemulsões catiônicas não alterou a potência antioxidante do AE. Com relação aos valores de CA<sub>50</sub>, pode-se afirmar que o AE (7,0 μM) apresenta uma potência antioxidante duas vezes maior que o ácido ascórbico (14,32 μM).

#### 2.4.6 Avaliação da interação das nanoemulsões catiônicas com a mucina

Neste estudo, o potencial mucoadesivo das nanoemulsões catiônicas foi avaliado após incubação das formulações com uma dispersão de mucina. As misturas resultantes foram avaliadas quanto ao tamanho de partícula e potencial zeta, e os resultados encontram-se demonstrados na Figura 2.11. A dispersão de mucina 250 μg/mL apresentou tamanho de 256 nm, e as nanoemulsões NEOA(4%,0 mM), NEOA(4%,0,01 mM) e NEOA(4%,0,05 mM), empregadas neste estudo, apresentaram tamanho médio de 341, 480 e 281 nm, respectivamente. Quando a mucina foi colocada em contato com diferentes concentrações

de nanoemulsões catiônicas (contendo oleilamina), o tamanho das partículas aumentou de modo dependente da concentração das mesmas (Figura 2.11 A). Por outro lado, para a nanoemulsão preparada sem oleilamina, um pequeno aumento foi observado. Considerando a formulação  $NE_{OA(4\%,0,05\text{ mM})}$ , um aumento de 281 (tamanho da NE antes de adicionar a suspensão de mucina) para 555 nm foi detectado, ou seja, as gotículas aumentaram cerca de duas vezes. Resultados semelhantes foram obtidos por Mazzarino et al. (2012), com nanopartículas de policaprolactona revestidas com quitosana. A incorporação das nanopartículas na dispersão de mucina resultou no aumento do tamanho das partículas em decorrência das interações entre a mucina e a quitosana.

O potencial zeta obtido para a dispersão de mucina foi cerca de -50 mV (Figura 2.11B). A mucina é uma glicoproteína constituída por um núcleo proteico, na qual estão ligadas cadeias de oligossacarídeos por meio de ligações O-glicosídicas. Os resíduos de açúcar que compõe as cadeias oligossacarídicas da mucina são principalmente galactose, fucose, N-acetilglucosamina, N-acetilgalactosamina e ácido siálico (SERRA, DOMÉNECH, PEPPAS, 2009). A carga negativa desta glicoproteína é, portanto, decorrente da ionização dos resíduos sulfatados e ácido siálico em valores de pH maiores que 2,6 (VARUM et al., 2008). As nanoemulsões  $NE_{OA(4\%,0\text{ mM})}$ ,  $NE_{OA(4\%,0,01\text{ mM})}$  e  $NE_{OA(4\%,0,05\text{ mM})}$ , empregadas neste estudo, apresentavam potencial zeta de -23,36, 28,32 e 38,1 mV, respectivamente. A adição das nanoemulsões catiônicas (com oleilamina) provocou uma redução dos valores de potencial zeta em módulo de modo dependente à concentração, enquanto aquela preparada na ausência de oleilamina, os valores de potencial zeta não pareceram variar significativamente. Portanto, o conjunto dos resultados - aumento de tamanho de partícula e neutralização parcial da carga da mucina indicou que tais sistemas apresentam boas propriedades mucoadesivas. Consequentemente, a capacidade das nanoemulsões de interagir com a carga negativa superficial da mucosa pode ser utilizada para aumentar o tempo de contato entre o sistema e a mucosa nasal, com potencial para aumentar a absorção do fármaco e favorecer o efeito terapêutico do AE contido nas nanoemulsões.



**Figura 2.11:** Variação do diâmetro hidrodinâmico (A) e potencial zeta (B) de uma dispersão de mucina (250µg/mL) em contato com nanoemulsões catiônica  $NE_{OA(4\%,0\text{ mM})}$ ,  $NE_{OA(4\%,0,01\text{ mM})}$  e  $NE_{OA(4\%,0,05\text{ mM})}$ .

#### 2.4.7 Estudos de permeação *in vitro* do ácido elágico através da mucosa nasal

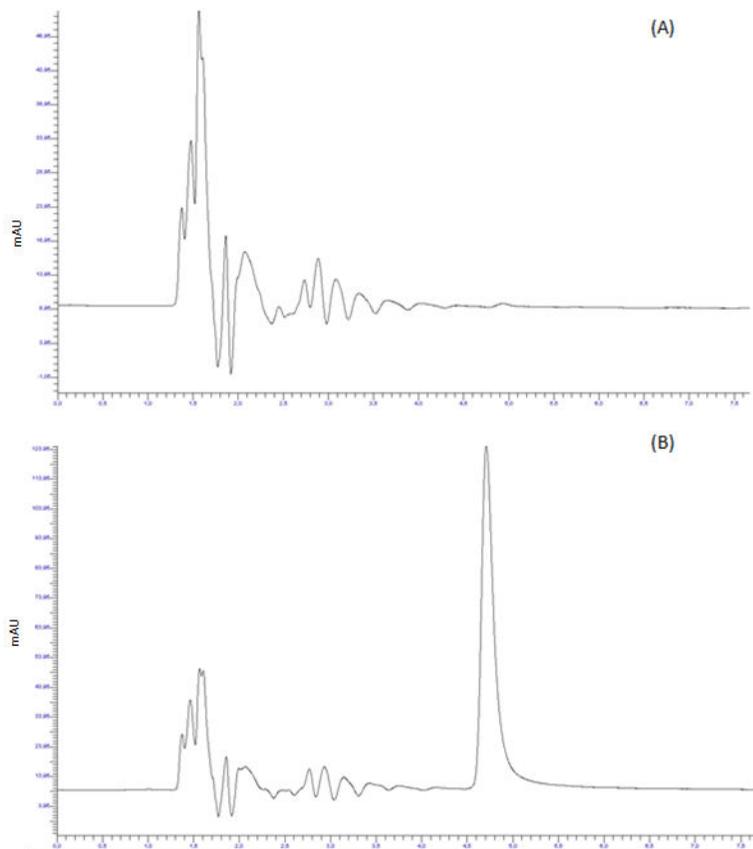
Estudos de liberação e permeação de fármacos requerem que o experimento seja realizado em condições *sink*, a qual é definida como uma situação de diluição infinita, onde não há saturação do fármaco no meio aceptor. Em geral, tem-se estipulado que a concentração máxima no meio aceptor não alcance a 10% ou 20% da solubilidade do mesmo.

Assim, se a substância for pouco solúvel no meio, admite-se a adição de solventes não aquosos ou outros solubilizantes para torná-lo *sink* (SINKO, 2008). Neste estudo, o meio acceptor selecionado foi tampão fosfato pH 7,4: PEG 400 (60:40, m/m) e a solubilidade do ácido elágico neste meio foi de 34  $\mu\text{g/mL}$ . Para determinação do ácido elágico permeado e retido na mucosa nasal, uma metodologia analítica de cromatografia líquida de alta eficiência foi desenvolvida e validada. Os resultados são demonstrados a seguir.

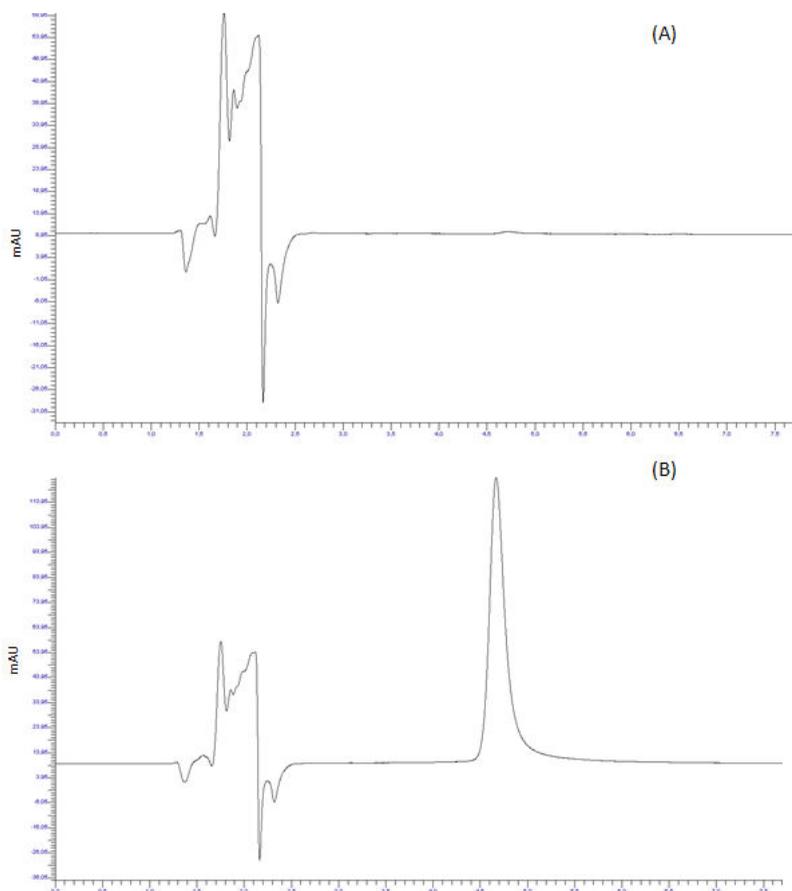
### **2.4.7.1 Validação do método analítico para determinação do ácido elágico permeado e retido na mucosa nasal**

#### **2.4.7.1.1 Especificidade**

A análise do ácido elágico por CLAE foi realizada conforme condições descritas em 2.3.6.3.1. Nessas condições, o ácido elágico exibiu um tempo de retenção de 4,71 min. A especificidade do método foi avaliada por meio da análise de nanoemulsão catiônica branca ( $\text{NE}_{\text{OA}}$  4%, 0,05 mM), após ensaio de permeação para o meio acceptor e extrator. Os cromatogramas obtidos foram comparados com aquele obtido para uma solução padrão de ácido elágico 1,0  $\mu\text{g/mL}$ , analisado nas mesmas condições para os dois meios avaliados (Figuras 2.12 e 2.13). Como pode ser observado, os componentes do meio ou da mucosa, após ensaio de permeação com nanoemulsões brancas, não interferiram no pico do ácido elágico, mostrando que o método é específico para determinação do fármaco nos estudos de permeação e retenção.



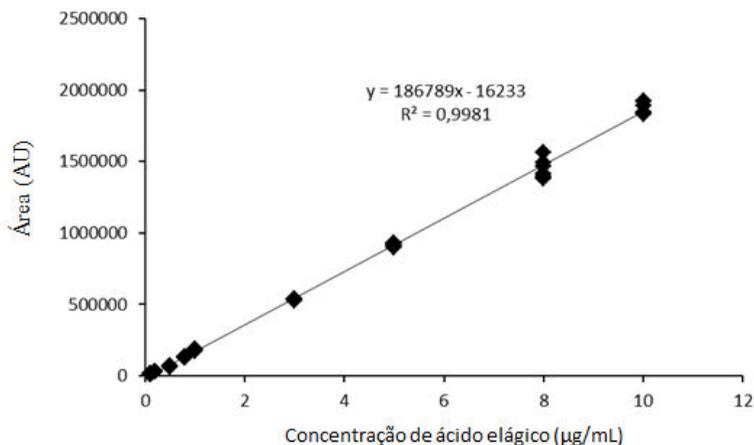
**Figura 2.12:** Cromatogramas obtidos após análise por CLAE das seguintes amostras: (A) solução tampão fosfato pH 6,4:PEG 400 (60:40, m/m) usada como meio acceptor contendo nanoemulsão catiônica branca (NE<sub>OA</sub> 4%, 0,05 mM) submetida ao ensaio de permeação, (B) solução tampão fosfato pH 6,4:PEG 400 (60:40, m/m) com solução padrão de ácido elágico (1 µg/mL).



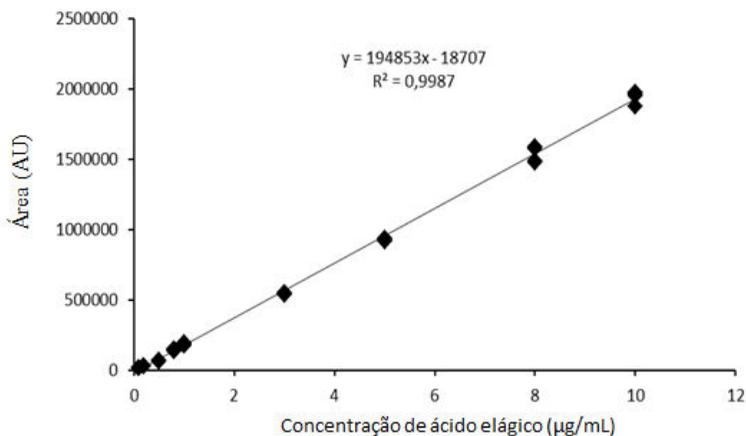
**Figura 2.13:** Cromatogramas obtidos após análise por CLAE das seguintes amostras: (A) metanol usado como meio extrator contendo nanoemulsão catiônica branca ( $NE_{OA}$  4%, 0,05 mM) submetida ao ensaio de permeação, (B) solução padrão de ácido elágico (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) diluído em metanol.

### 2.4.7.1.2 Linearidade

As curvas de calibração do ácido elágico foram obtidas em tampão fosfato pH 6,4:PEG 400 (60:40, m/m) e metanol (meio extrator), ambas na faixa de concentração de 0,1 a 10,0  $\mu\text{g/mL}$  (Figuras 2.14 e 2.15). As equações da reta foram calculadas foram  $y = 186789x - 16233$  para a curva de calibração do ácido elágico no meio receptor, e  $y = 194853x - 18707$  no meio extrator, com coeficientes de correlação ( $R^2$ ) de 0,9981 e 0,9987, respectivamente. Estes resultados indicaram a linearidade do método na faixa de concentração testada.



**Figura 2.14:** Curva de calibração do ácido elágico obtida por CLAE em meio tampão fosfato pH 6,4:PEG 400 (60:40, m/m) para estudo de permeação na faixa de concentração de 0,1 a 10  $\mu\text{g/mL}$ .



**Figura 2.15:** Curva de calibração do ácido elágico obtida por CLAE em meio extrator (metanol) para estudo de retenção do fármaco na mucosa nasal, na faixa de concentração de 0,1 a 10 µg/mL.

Particularmente neste estudo, os valores de LQ e LD são muito importantes, pois o ácido elágico pode permear através da mucosa em quantidades baixas. Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram calculados usando os valores de intercepto e inclinação obtidos a partir da média de três curvas de calibração. Para a curva de ácido elágico em solução tampão fosfato pH 6,4:PEG 400 (60:40, m/m), o desvio padrão dos interceptos e a inclinação média das curvas foram de 351736,36 e 186850,5, respectivamente. Assim, os valores calculados de LD e LQ para o método de quantificação do ácido elágico neste meio foram de 0,06 µg/mL e 0,19 µg/mL, respectivamente.

Para a curva de ácido elágico em metanol, o desvio padrão dos interceptos e a inclinação média das curvas foram de 194853,2 e 2741,12 respectivamente. Os valores calculados de LD e LQ para o método de quantificação do ácido elágico neste meio foram de 0,05 µg/mL e 0,14 µg/mL, respectivamente.

### 2.4.7.1.3 Precisão

Os resultados de repetibilidade e precisão intermediária e do método de quantificação do ácido elágico nos estudos de permeação e

retenção estão demonstrados nas Tabelas 2.8 e 2.9, respectivamente. Os valores referentes à recuperação e desvio padrão mostram que o método apresentou variabilidade satisfatória e valores de DPR menores que 5 %, indicando a precisão do método nos dois meios avaliados.

**Tabela 2.8:** Resultados obtidos na repetibilidade (precisão intradia) e precisão intermediária (interdia) e do método de quantificação do ácido elágico no meio acceptor por CLAE após 12 horas de estudo de permeação.

	Conc. Teórica AE ( $\mu\text{g/mL}$ )	Conc. Obtida AE ( $\mu\text{g/mL}$ )	DPR (%)
Intradia	0,5	0,49	0,86
	0,8	0,79	3,81
	3,0	3,07	1,29
Interdia	0,5	0,49	0,99
		0,52	1,03
		0,48	0,96
	0,8	0,76	1,83
		0,81	1,51
		0,82	1,97
	3,0	3,09	1,12
		3,05	1,29
		3,07	1,31

**Tabela 2.9:** Resultados obtidos na repetibilidade (precisão intradia) e precisão intermediária (interdia) do método de quantificação do ácido elágico no meio extrator por CLAE, após 12 horas de estudo de permeação.

	Conc. Teórica AE ( $\mu\text{g/mL}$ )	Conc. Obtida AE ( $\mu\text{g/mL}$ )	DPR (%)
Intradia	0,5	0,52	1,39
	0,8	0,83	1,82
	3,0	3,00	1,14
Interdia	0,5	0,54	0,84
		0,52	0,73
		0,49	0,78
	0,8	0,89	1,65
		0,74	1,78
		0,81	1,62
	3,0	3,03	1,12
		2,98	1,29
		2,99	1,31

#### 2.4.7.1.4 Exatidão

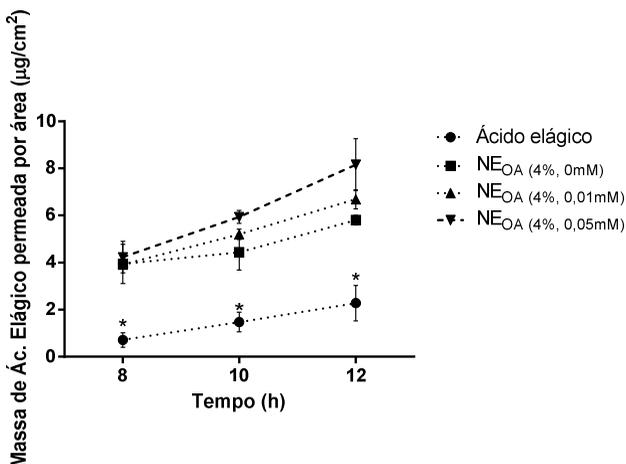
A exatidão do método foi avaliada pela análise do meio aceptor e extrator contaminado com solução padrão de ácido elágico, após estudo de permeação com as nanoemulsões isentas de ácido elágico. A recuperação foi expressa em porcentagem em relação à quantidade de fármaco adicionada teoricamente às amostras em três níveis de concentração conforme a Tabela 2.10. O método foi considerado exato, nos dois meios avaliados, pois apresentaram valores de recuperação adequados e DPR menor que 5%.

**Tabela 2.10:** Resultados obtidos na exatidão do método de quantificação de ácido elágico contido nas nanoemulsões catiônicas dissolvido em meio acceptor (tampão fosfato pH 6,4 e PEG 400 40%) e extrator (metanol) submetido à 12 horas de estudo de permeação.

Amostra	Concentração de		Recuperação (%)	DPR (%)
	Ácido. Elágico (µg/mL) Teórica	Encontrada		
Meio Aceptor	1,00	0,99	99,83	2,63
	1,50	1,55	103,65	1,91
	3,00	3,54	101,14	2,53
Meio extrator	1,00	1,01	100,49	2,60
	1,50	1,54	103,11	1,68
	3,00	3,46	99,90	1,64

#### 2.4.7.2 Estudo de permeação e retenção do ácido elágico através da mucosa nasal

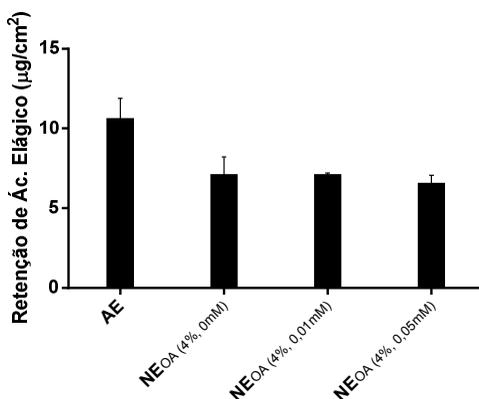
As formulações selecionadas para o ensaio de permeação e retenção foram a NE<sub>OA</sub> (4%, 0mM), NE<sub>OA</sub> (4%, 0,01mM) e NE<sub>OA</sub> (4%, 0,05mM). Nanoemulsões catiônicas com diferentes quantidades de oleilamina foram testadas com o intuito de avaliar o efeito do lipídeo catiônico na permeação do ácido elágico. Além destas amostras, foi realizado o teste de permeação usando uma solução de ácido elágico dissolvido no meio acceptor (tampão fosfato pH 6,4:PEG 400 60:40, m/m) na concentração de 0,25 mg/mL. Para todas as amostras foi aplicada uma quantidade contendo uma massa correspondente a 80 µg de ácido elágico no compartimento doador. Os perfis de permeação foram representados graficamente como massa de ácido elágico permeado por unidade de área *versus* tempo (Figura 2.16).



**Figura 2.16:** Perfil de permeação do ácido elágico livre e contido em nanoemulsões através da mucosa nasal suína.

Como pode ser observado na Figura 2.16, um aumento da quantidade permeada do AE ocorreu com o aumento da concentração do lipídeo catiônico nas nanoemulsões, porém as diferenças verificadas não foram estatisticamente significativas. Em contrapartida, diferenças significativas nos valores de massa de ácido elágico permeado foram obtidas quando o ácido elágico livre (não associado às nanoemulsões) foi testado, em comparação aos valores obtidos para as nanoemulsões, em todos os tempos analisados. Este estudo mostrou, portanto, que independente da presença de lipídeo catiônico, a veiculação do AE em nanoemulsões é vantajosa, pois possibilita o aumento da permeação deste polifenol através da mucosa nasal. Este resultado se deve ao seu elevado grau de dispersão e a baixa tensão interfacial das gotículas de óleo/água que permitem, nestes sistemas, que o fármaco se deposite uniformemente nos tecidos, oferecendo uma elevada superfície de contato para absorção (BOUCHEMAL et al., 2004; ALMEIDA, TEIXEIRA, KOESTER, 2008). Por outro lado, o efeito da mucoadesão sobre a biodisponibilidade do AE por via nasal não poderia ser verificada neste estudo, visto que este efeito está relacionado ao tempo de permanência da formulação na cavidade nasal, e poderia ser evidenciado unicamente em estudos *in vivo*.

Após o estudo de permeação, as mucosas foram removidas das células de Franz, secas com papel absorvente, picotadas e submetidas à extração com metanol *overnight*. As misturas foram filtradas e as soluções resultantes quantificadas por CLAE. Os resultados de massa retida por área ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) de ácido elágico na mucosa nasal estão demonstrados na Figura 2.17. Pode-se observar que houve maior retenção do ácido elágico livre em relação às nanoemulsões, porém diferenças significativas não foram observadas entre os valores médios de massa de AE retida na membrana ( $p>0,05$ ).



**Figura 2.17:** Massa de ácido elágico por área retido na mucosa nasal suína em estudo de permeação em célula do tipo Franz.

---

---

CONCLUSÕES PARCIAIS

---

---

- A preparação de nanoemulsões catiônicas pela técnica da emulsificação espontânea se mostrou viável, reprodutível e de fácil execução. O aumento na concentração dos lipídeos catiônicos (oleilamina e estearilamina) determinou o acréscimo da carga superficial evidenciada pelo potencial zeta positivo. O pH das nanoemulsões também aumentou conforme a concentração dos dois lipídeos catiônicos e as nanoemulsões contendo (0,01 e 0,05 mM de EA ou OA) se mostraram sistemas monodispersos com tamanho nanométrico.
- Foi desenvolvida e validada com sucesso uma metodologia analítica por fluorescência, prática e econômica. Esta metodologia foi considerada linear, precisa, exata e robusta pelos resultados obtidos na validação.
- A inclusão do AE nas nanoemulsões desenvolvidas foi obtida conforme valores de eficiência de encapsulação do ácido elágico acima de 95,50% que demonstram a associação do fármaco às nanoemulsões. O teor de ácido elágico nas nanoemulsões variou de 0,068 – 0,323 mg/mL, além disso os valores de potencial zeta e pH também variaram com a adição do fármaco aos sistemas.
- A atividade antioxidante das nanoemulsões catiônicas contendo ácido elágico foi avaliada pelo método do DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil). Os valores médios das concentrações antioxidantes de 50% das espécies radicalares ( $CA_{50}$ ) foram de 7,0  $\mu$ M para o AE puro e de 6,3 mM a 7,5 mM para as nanoemulsões catiônicas ( $NE_{OA}$  (4%, 0mM);  $NE_{OA}$  (4%, 0,01mM);  $NE_{OA}$  (4%, 0,05mM);  $NE_{OA}$  (8%, 0mM);  $NE_{OA}$  (8%, 0,01mM) e  $NE_{OA}$  (8%, 0,05mM) contendo ácido elágico, não havendo diferença significativa entre os valores encontrados. Estes resultados indicam que a técnica de obtenção das nanoemulsões catiônicas não alterou a potência antioxidante do ácido elágico.
- O potencial mucoadesivo das nanoemulsões catiônicas foi avaliado após incubação das formulações com uma dispersão de mucina. Considerando a nanoemulsão preparada  $NE_{OA}(4\%,0,05\text{ mM})$ , um aumento de 306 (tamanho da NE antes de adicionar a suspensão de mucina) para 555 nm foi detectado, ou seja, as gotículas aumentaram cerca de duas vezes. O potencial zeta obtido para a dispersão de mucina foi cerca de -

50 mV. As nanoemulsões  $NE_{OA(4\%,0\text{ mM})}$ ,  $NE_{OA(4\%,0,01\text{ mM})}$  e  $NE_{OA(4\%,0,05\text{ mM})}$ , empregadas neste estudo, apresentavam potencial zeta de -52,1, 28,32 e 38,1 mV, respectivamente. A adição das nanoemulsões catiônicas (com oleilamina) provocaram redução dos valores de potencial zeta em módulo de modo dependente à concentração. O conjunto dos resultados - aumento de tamanho de partícula e neutralização parcial da carga da mucina indica que tais sistemas apresentam propriedades mucoadesivas.

- Para a realização dos estudos de permeação utilizando como membrana modelo a mucosa nasal suína para a determinação do ácido elágico permeado [meio: tampão fosfato pH 6,4: polietileno glicol 400 (60:40)] uma metodologia analítica de cromatografia líquida de alta eficiência foi desenvolvida e validada e se mostrou específica e linear na faixa de 0,1-10,0  $\mu\text{g/mL}$ , com LQ e LD estimados em 0,19 e 0,06  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente. O método foi considerado específico, preciso com DPR (%) menor que 3,81 nos ensaios de precisão intra e inter-dia com DPR (%) menor que 1,97, exato com recuperação (DPR) do AE de 99,83% (2,63); 103,65% (1,91); 101,14% (2,53).
- Para a determinação do ácido elágico extraído (meio: metanol) a partir da membrana modelo a mucosa nasal suína, uma metodologia analítica de cromatografia líquida de alta eficiência foi desenvolvida e validada e se mostrou específica e linear na faixa de 0,1-10,0  $\mu\text{g/mL}$ , com LQ e LD estimados em 0,14 e 0,05  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente. O método foi considerado específico, preciso com DPR (%) menor que 1,82 nos ensaios de precisão intra e inter-dia com DPR (%) menor que 178, exato com recuperação (DPR) do AE de 100,49% (2,60); 103,11% (1,68); 99,90% (1,64).
- O estudo de permeação do ácido elágico livre e nanoemulsionado em célula tipo Franz e utilizando mucosa nasal suína como modelo de membrana demonstrou discreto acréscimo na permeação do ácido elágico nas nanoemulsões conforme o aumento da concentração de OA, porém sem diferença estatística. Em contra partida, pode-se observar diferença significativa ( $p < 0,05$ ) na permeação do ácido elágico isolado em relação às nanoemulsões. O AE contido nas nanoemulsões aumentou a massa permeada por área em cerca de três vezes em comparação com o AE isolado.

---

---

**CAPÍTULO 3: AVALIAÇÃO FARMACOLÓGICA DA ADMINISTRAÇÃO INTRANASAL E ORAL DO ÁCIDO ELÁGICO, ISOLADAMENTE OU EM SISTEMAS NANOEMULSIONADOS, EM UM MODELO EXPERIMENTAL DA DOENÇA DE ALZHEIMER EM CAMUNDONGOS**

---

---

### 3.1 Introdução

A doença de Alzheimer (DA) é uma doença neurodegenerativa caracterizada pelo declínio progressivo no número de neurônios colinérgicos que se projetam, principalmente, do prosencéfalo basal para áreas corticais e formação hipocampal, sendo a causa mais comum de prejuízos cognitivos em indivíduos com mais de 65 anos de idade (GALLAGHER, COLOMBO, 1995).

As principais alterações neuropatológicas verificadas no cérebro de portadores da DA incluem a formação de placas senis e o aparecimento de emaranhados neurofibrilares. As placas senis são caracterizadas pelo depósitos de proteínas amiloides insolúveis, constituídos pelo peptídeo  $\beta$ -amiloide ( $A\beta$ ), o qual é composto por 40-42 aminoácidos (SISODIA, PRICE, 1995; SELKOE, 1999). O  $A\beta$  é um fragmento proteolítico formado a partir da proteína precursora amiloide (APP) que sofre a ação das enzimas proteolíticas  $\alpha$ -,  $\beta$ - e  $\gamma$ -secretases (Haass e cols., 2004). Os mecanismos responsáveis pela neurotoxicidade do  $A\beta$  são complexos e parecem estar associados com o perda da função mitocondrial, redução do metabolismo cerebral da glicose, indução de estresse oxidativo, e ativação da morte celular programada (apoptose) (GÓMEZ-ISLA et al., 1997; ZHU et al., 2001). Marcadores de estresse oxidativo são encontrados no micro-ambiente próximo aos depósitos de  $A\beta$  na DA (HUANG et al., 1999; TABNER et al., 2006).

Os emaranhados neurofibrilares são constituídos primariamente de proteína Tau associadas à microtúbulos. A proteína Tau c é responsável por conferir estabilidade aos microtúbulos do citoesqueleto neural, sendo esta função regulada por um processo de fosforilação e defosforilação. Nos neurônios de pacientes com DA, as proteínas Tau associadas aos microtúbulos apresentam-se anormalmente hiperfosforiladas (NAGY et al., 1995).

No sentido de mimetizar as principais alterações neuropatológicas verificadas no cérebro de indivíduos com a DA, os modelos animais tem desempenhado um papel importante na definição de mecanismos relacionados com a doença e ainda para avaliar novas abordagens terapêuticas, assim como os tratamentos atualmente utilizados em ensaios clínicos tiveram origem dos estudos em animais de laboratório (principalmente roedores) (LAFERLA, GREEN, 2012).

Atualmente, diferentes modelos capazes de induzir o acúmulo do peptídeo A $\beta$  no cérebro de roedores vêm sendo utilizados para estudar os processos relacionados ao desenvolvimento e progressão da DA. Prejuízos cognitivos têm sido documentados em roedores após a administração central aguda ou crônica dos fragmentos A $\beta$ 1-40 ou A $\beta$ 1-42, que são análogos dos peptídeos encontrados nas placas senis dos pacientes com a DA (HSIAO et al., 1996; WESTERMAN et al., 2002; MEDEIROS et al., 2007; PREDIGER et al., 2007). Além disso, tem sido demonstrado que a administração central (por exemplo, pela via intracerebroventricular – i.c.v.) destes fragmentos em roedores é capaz de promover um prejuízo em testes comportamentais que avaliam função cognitiva como, por exemplo, nos testes de reconhecimento do objeto (FURUKAWA-HIBI et al., 2011; SANTOS et al., 2012), labirinto em Y (MCDONALD et al., 1996) e labirinto aquático de Morris (NITTA et al., 1994).

Neste trabalho foi utilizado o modelo experimental da DA que consiste na infusão i.c.v. do peptídeo A $\beta$ 1-40 humano em camundongos, sendo que este apesar de não levar à formação de placas senis, é capaz de induzir um processo neurodegenerativo através de diferentes mecanismos, incluindo a neuroinflamação (PREDIGER et al., 2007), excitotoxicidade glutamatérgica (LAUDERBACK et al., 1999) e estresse oxidativo (BALAZS, LEON, 1994; WILSON, MICKLEY, MATERA, 2010). Este último devido ao fato do peptídeo gerar radicais livres e uma produção excessiva de espécies reativas de oxigênio (ERO) causando danos celulares e morte neuronal (ZHAO et al., 2012). Portanto, tratamentos farmacológicos com antioxidantes têm demonstrado reverter o dano causado pela infusão do peptídeo A $\beta$ 1-40 (JHOO et al., 2004; WILSON, MICKLEY, MATERA, 2010; SANTOS et al., 2012). Neste sentido, diversos antioxidantes estão sendo avaliados com este propósito, dentre eles um polifenol derivado dimérico do ácido gálico, o AE (PRIYADARSINI et al., 2002). Este polifenol apresenta inúmeros efeitos farmacológicos como anticarcinogênico (ZHANG et al., 2004), antimutagênico (KAUR, GROVER, KUMAR, 1997), antioxidante (COZZI et al., 1995), anti-inflamatório (ROGERIO et al., 2006).

Para avaliar o déficit cognitivo causado pela à infusão i.c.v. do peptídeo A $\beta$ 1-40 em camundongos e o potencial terapêutico do ácido elágico, foram utilizados testes comportamentais que avaliam características de emocionalidade (ansiedade e depressão), caráter

mnemônico e também marcadores bioquímicos de estresse oxidativo tais como: níveis de tióis não protéicos (NPSH), atividade das enzimas glutatona redutase (GR), glutatona peroxidase (GPx), catalase (CAT), e acetilcolinesterase (Ache) e níveis de lipoperoxidação tecidual (TBARS).

Sendo assim, este capítulo relata o efeito da administração do AE isolado e contido na nanoemulsão NEOA (4%, 0,05mM) que foi desenvolvida, caracterizada e escolhida por resultados descritos no capítulo anterior; à camundongos, por sete dias consecutivos antes da infusão i.c.v. do peptídeo A $\beta$ 1-40 e por mais quatorze dias subsequentes, totalizando vinte e um dias de tratamento. Durante este período foram realizados testes comportamentais para avaliar a função motora e o déficit cognitivo causado pela infusão do peptídeo e após os vinte e um dias da infusão de A $\beta$ 1-40, os animais foram eutanasiados e o córtex pré-frontal e o hipocampo foram removidos e submetidos à ensaios para a determinação de marcadores bioquímicos relacionados a estresse oxidativo.

## 3.2 Materiais

### 3.2.1 Materias primas

- Ácido elágico (Sigma Aldrich, Alemanha)
- Peptídeo A $\beta$ <sub>1-40</sub> humano (Sigma Aldrich, Alemanha)

### 3.2.2 Solventes e reagentes

- Ácido acético (Vetec, Brasil)
- Ácido 5,5 ditiobis 2-nitrobenzóico (Sigma, USA)
- Ácido tiobarbitúrico (Sigma, USA)
- Ácido tricloroacético (Vetec, Brasil)
- Albumina de soro bovino (Sigma, USA)
- Dodecil sulfato de sódio (Vetec, Brasil)
- Fosfato de potássio dibásico (Vetec, Brasil)
- Fosfato de potássio monobásico (Vetec, Brasil)
- Glutaciona oxidada (Sigma, USA)
- Glutaciona redutase (Sigma, USA)
- Glutaciona reduzida (Sigma, USA)
- Isoflorano (Abbot, Brasil)
- Iodeto de acetiltiocolina (Sigma, USA)
- Malondialdeído (Sigma, USA)
- Nicotinamida adenina dinucleotídefostato reduzida (Sigma, USA)
- Peróxido de *tert*-butila (Sigma, USA)
- Peróxido de hidrogênio (Vetec, Brasil)
- Tween 80 (Sigma Aldrich, Alemanha)

### 3.2.3 Equipamentos

- Balança Katashi
- Balança analítica (Shimadzu, Japão)
- Centrífuga para Eppendorf (Eppendorf, Brasil)
- Leitor de microplacas (TECAN Genios Microplate Reader, Suíça)

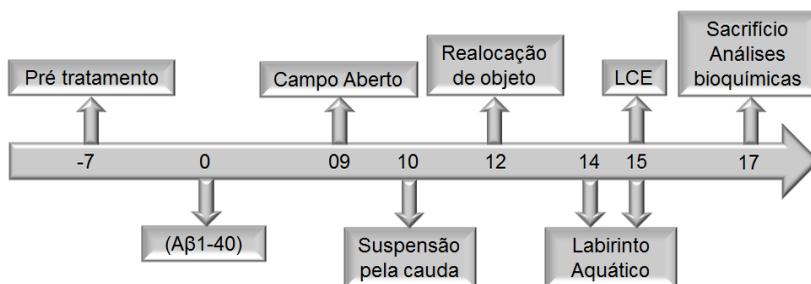
### 3.2.4 Animais

Foram utilizados camundongos suíços machos (40 - 55 g) provenientes do Biotério Central da UFSC. Os animais foram mantidos no biotério do Laboratório Experimental de Doenças Neurodegenerativas (BIO039), localizado no Depto. de Farmacologia da Universidade Federal de Santa Catarina (CCB/UFSC), em ambiente com temperatura controlada ( $23 \pm 1$  °C) e ciclo claro-escuro de 12 horas (fase clara 7:00-19:00 horas). Alimento e água disponibilizados *ad libitum*. Além disso, todos os protocolos experimentais utilizados neste projeto foram previamente aprovados pelo Comitê de Uso de Animais da UFSC - CEUA/UFSC (Protocolo: 104/CEUA/PRPE/2012).

### 3.3 Métodos

#### 3.3.1 Administração do ácido elágico e cronograma dos ensaios

Uma suspensão de ácido elágico (2 mg/mL) foi preparada em água contendo 1% de Tween 80, para a administração oral do fármaco puro e as nanoemulsões contendo ácido elágico foram preparadas conforme o item 2.3.1. A administração do fármaco pela via oral ou nasal nos animais iniciou 7 dias antes da administração i.c.v. do peptídeo A $\beta$ 1-40 e terminou no 17º dia após a administração do peptídeo. Os testes comportamentais e bioquímicos foram realizados conforme esquema ilustrado na Figura 3.1.



**Figura 3.1:** Cronograma de execução dos testes comportamentais e análises bioquímicas (LCE= labirinto em cruz elevado).

#### 3.3.2 Modelo experimental *in vivo* da doença de Alzheimer

O fragmento A $\beta$ 1-40 (Sigma Aldrich, Alemanha) foi dissolvido em PBS (pH 7,4; 1 mg/ml) e incubado a 37 °C por 3 –4 dias, como descrito previamente (STERU et al., 1985; PREDIGER et al., 2007). A forma agregada dos fragmentos de A $\beta$  (400 pmol/camundongo) ou a solução veículo (PBS) foi administrada por via i.c.v. como descrito por Laursen e Belknap (1986). Sucintamente, os animais foram levemente anestesiados com isofurano (0.96%) (0.75 CAM; Abbot Laboratórios do Brasil Ltda., RJ, Brasil) usando um sistema de vaporização (SurgiVet Inc., WI, EUA). Uma microseringa

(Hamilton) com uma agulha (26 gauges e 3 mm de comprimento) foi inserida unilateralmente (1 mm) no ponto médio equidistante entre os olhos, e a uma distância igual entre os olhos e as orelhas, perpendicular ao plano do crânio. As soluções foram injetadas gradualmente durante um intervalo de 3 s.

### 3.3.2.1 Grupos experimentais

Para a administração do AE isolado por via oral (gavagem) os seguintes controles foram utilizados: água contendo 1% de Tween 80 (veículo da suspensão) sem a administração do beta-amiloide, (veículo da suspensão) com a administração do beta-amiloide, suspensão do ácido elágico sem a administração do beta-amiloide.

Para a administração do AE contido nas nanoemulsões ( $NE_{OA}$  (4%, 0,05mM)) por via oral (gavagem) e nasal os seguintes controles foram utilizados:  $NE_{OA}$  (4%, 0,05mM) isenta de AE sem a administração do peptídeo beta-amiloide,  $NE_{OA}$  (4%, 0,05mM) isenta de AE com a administração do peptídeo beta-amiloide,  $NE_{OA}$  (4%, 0,05mM) contendo AE sem a administração do peptídeo beta-amiloide.

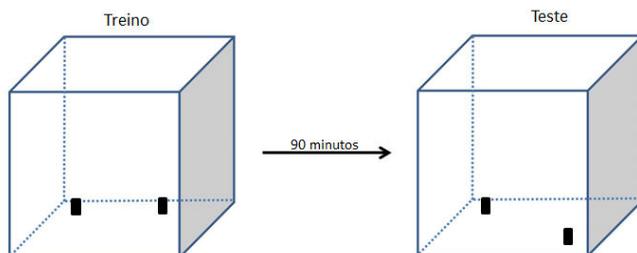
### 3.3.2.2 Testes comportamentais

#### 3.3.2.2.1 Campo aberto

Para avaliar possíveis alterações locomotoras induzidas pelos diferentes tratamentos, os animais foram avaliados durante 5 minutos no teste do campo aberto seguindo o protocolo descrito por Prediger e colaboradores (2007; 2008). O aparato, feito de madeira e fórmica, é formado por um chão de cor preta (30 x 30 cm), dividido em 9 quadrantes de 10 x 10 cm, com paredes transparentes de 15 cm de altura. Durante os experimentos, cada camundongo foi colocado no centro do campo aberto, sendo que um sistema de câmera de vídeo captou as imagens do campo aberto, sendo registrado o número de quadrantes cruzados e os atos de levantar. As imagens foram posteriormente analisadas no software ANY-maze<sup>TM</sup>

### 3.3.2.2 Realocação de objeto

O teste de realocação de objeto foi realizado conforme o protocolo descrito Assini e colaboradores (2009) e consistiu em colocar os animais individualmente no centro do aparato do campo aberto com dois objetos idênticos para a exploração durante três minutos. Como o centro do campo aberto é ansiogênico em camundongos, os objetos (dois retângulos plásticos idênticos 3,0 cm lado x 4,5 cm lado x 4,5 cm altura) foram colocados sete centímetros de distância das paredes para minimizar os efeitos de ansiedade. O procedimento consistiu em uma seção de treino no qual o animal foi submetido à caixa contendo dois objetos idênticos durante 3 minutos para explorá-la livremente. Após o treino, os animais foram colocados em outra caixa e aguardaram até o momento do teste. O intervalo entre o treino e teste foi de 90 minutos e neste último os animais foram colocados novamente no aparato com os dois objetos, porém um dos objetos foi realocado para o lado oposto (Figura 3.2). O tempo de exploração dos objetos foi medido com um cronômetro quando os camundongos cheiraram, estiveram no local, ou se aproximaram dos objetos a menos de 1 cm de distância e as sessões foram gravadas e posteriormente analisadas. Depois de cada treino e teste, o campo aberto e os objetos foram limpos com álcool 10% evitando a impregnação de odores. Vale ressaltar que foi realizado um controle motor dos animais através da análise da distância percorrida utilizando-se para isto o software ANY-maze<sup>TM</sup>.



**Figura 3.2:** Representação esquemática do teste de realocação de objetos. Onde o índice de localização de objetos é dado pelo tempo (s) objeto realocado x 100/ tempo (s) objeto realocado + tempo (s) objeto encontrado no local do treino.

### **3.3.2.2.3 Suspensão pela cauda**

O procedimento de suspensão pela cauda é similar ao descrito por Steru e colaboradores (1985). Os animais foram fixados pela cauda com o auxílio de fita adesiva e suspensos à 70 cm do chão durante 6 minutos. Durante este período os animais foram observados e o tempo de imobilidade foi registrado. A imobilidade foi definida como ausência total de movimentação do animal é utilizada como um parâmetro de comportamento do tipo depressivos, sendo que fármacos antidepressivos reduzem este parâmetro.

### **3.3.2.2.4 Teste do labirinto aquático**

O labirinto aquático consiste de um tanque circular de cor preta (97 cm de diâmetro e 60 cm de altura), baseado no modelo proposto por Morris e colaboradores (1982), e localizado no interior de uma sala com várias pistas visuais fixadas nas paredes. O tanque foi preenchido com água até a altura de 60 cm, sendo a temperatura da água mantida à temperatura constante ( $25 \pm 2$  °C) através de um sistema automatizado de resistências. Foram estabelecidas 4 posições de partida (Norte, Sul, Leste e Oeste) que dividiam a superfície do labirinto em 4 quadrantes (Nordeste, Noroeste, Sudeste e Sudoeste). A plataforma utilizada era de acrílico transparente (10 x 10 cm) e permaneceu submersa 1 cm da superfície da água. Durante os experimentos, um sistema de câmera de vídeo captou as imagens do labirinto aquático, sendo estas gravadas em DVD e a latência gasta pelos animais para encontrar a plataforma, bem como a distância percorrida e a velocidade de nado foram analisadas posteriormente através do analisador de imagens ANY-maze<sup>TM</sup>.

Na presente proposição foi avaliada a memória espacial de referência dos animais utilizando o procedimento descrito por Prediger e colaboradores (2007; 2008). Durante o treinamento (dia 1), os animais foram liberados para nadar até encontrar a plataforma ou até um tempo máximo de 60 s. Caso o animal não encontrasse a plataforma nesse tempo, ele foi conduzido manualmente até esta, onde permaneceu por 10 s. Após os 10 s, o animal foi retirado do labirinto e colocado em uma caixa por 20 s, sendo então posicionado no ponto de partida seguinte. Este procedimento foi realizado 10 vezes consecutivas na sessão de

treino, sendo que os animais foram sempre liberados de pontos de partida diferentes de uma forma pseudoaleatória e a plataforma submersa permaneceu na mesma posição (quadrante Sudeste). Na sessão de teste, realizada 24 h após a sessão de treinamento, os animais foram novamente liberados para nadar a partir da posição Norte, no entanto, a plataforma foi removida. O teste teve duração de 60 segundos, e o tempo de nado gasto pelos animais no quadrante correto, isto é, onde se encontrava a plataforma na sessão de treino (no dia anterior), foi utilizado como índice de memória.

### **3.3.2.2.5 Labirinto em cruz elevado**

O aparato consistiu de um labirinto de madeira recoberto por fórmica preta composto por dois braços abertos (18 x 6 cm) unidos ortogonalmente a dois braços fechados com paredes forradas de preto, elevados 60 cm do solo por um suporte de madeira (modificado de Lister, 1987). O animal foi colocado no centro do aparato voltado para um dos braços fechados sendo permitido explorar livremente o aparato durante 5 minutos. Os experimentos foram gravados permitindo a leitura posterior dos comportamentos realizados pelo animal (LISTER, 1987). O número de entradas (definida pela colocação das quatro patas num braço) e o tempo de permanência gasto nos braços abertos e fechados foram registrados. A porcentagem do número de entradas nos braços abertos e o tempo de permanência nos braços abertos foram calculados pelo número total de entradas nos braços. O número de entradas do braço fechado foi utilizado como uma medida da atividade locomotora.

### **3.3.2.2.6 Análise estatística para os testes comportamentais**

Análise estatística foi realizada por meio da análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Bonferroni ( $P < 0,05$ ), utilizando o software Graph-Pad Prism (San Diego, CA, USA).

### **3.3.2.3 Marcadores bioquímicos de estresse oxidativo**

#### **3.3.2.3.1 Preparação tecidual para as análises bioquímicas**

Com o objetivo de avaliar possíveis alterações bioquímicas que permitam evidenciar eventos neuropatológicos e/ou neuroproteção após a administração i.c.v. do peptídeo  $\beta$ -amilóide humano ( $A\beta_{1-40}$ ) e/ou

administração oral ou intranasal dos sistemas nanoestruturados ou do fármaco isolado, vinte e quatro dias após o início dos experimentos os animais foram eutanasiados por decapitação e o córtex pré-frontal e hipocampo foram removidos e homogeneizados em 10 volumes de tampão HEPES 20 mM, pH 7,4. Os homogenatos foram centrifugados a 3.000 x g por 5 minutos a 4°C e uma alíquota do sobrenadante foi utilizada na determinação da atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE). Para a determinação da atividade das enzimas antioxidantes glutatona peroxidase (GPx), glutatona redutase (GR) e catalase (CAT), e medida dos níveis de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e níveis de tióis não protéicos, os sobrenadantes da primeira centrifugação foram novamente centrifugados a 16.000 x g a 4°C por 20 minutos e o sobrenadante gerado foi utilizado nas análises.

### **3.3.2.3.2 Avaliação da atividade da Acetilcolinesterase (AChE)**

A atividade da AChE foi determinada pelo método de Ellman (ELLMAN et al., 1961). Esse método baseia-se na taxa de hidrólise do iodeto de acetiltiocolina, que é medida em 412 nm. Isto é acompanhado por uma reação da tiocolina com o ácido 5',5 – ditiobis-2-nitrobenzóico (DTNB) para produzir o ânion ácido 2-nitro-5-mercapto -benzóico (TNB), de cor amarela. A atividade da AChE foi expressa em nmol de substrato hidrolisado/min/mg de proteína.

### **3.3.2.3.3 Avaliação da atividade da Glutaciona Peroxidase (GPx)**

A atividade da GPx foi determinada através do método de Wendel, utilizando peróxido de *terc*-butila como substrato (WENDEL, 1981). A GPx catalisa a redução de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, bem como outros peróxidos orgânicos, utilizando a glutatona reduzida (GSH) como co-substrato e produzindo glutatona oxidada (GSSG). A GSSG é reduzida pela glutatona redutase com o consumo de NADPH, que foi mensurado através da leitura em espectrofotômetro em 340 nm. A atividade da GPx foi expressa em nmol de NADPH oxidado/min/mg de proteína.

#### **3.3.2.3.4 Avaliação da atividade da Glutathiona Redutase (GR)**

A atividade da GR foi determinada através do método descrito por Carlberg e Mannervik (1985). A taxa de redução da glutathiona oxidada (GSSG) foi determinada indiretamente através do monitoramento do consumo (oxidação) do NADPH a 340 nm. A atividade da GR foi expressa em nmol de NADPH oxidado/min/mg de proteína.

#### **3.3.2.3.5 Avaliação da atividade da Catalase (CAT)**

A atividade da CAT foi medida pelo método de Aebi (1974). A reação foi iniciada pela adição de 300 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e a taxa de consumo do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi medida espectrofotometricamente a 240 nm e expressa como μmol de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/minuto/mg de proteína.

#### **3.3.2.3.6 Tióis não proteicos**

A concentração de Tióis não protéicos (NPSH) foi determinada através do método descrito por Ellman (1959) (1963), que determina principalmente glutathiona reduzida (GSH). As amostras foram precipitadas em ácido tricloroacético (TCA) 10% gelado e centrifugadas a 5.000 x g por 10 minutos. O sobrenadante foi incubado com DTNB em tampão fosfato 1 M pH 7,0. As absorbâncias foram mensuradas em 412 nm e uma curva de glutathiona reduzida foi utilizada para calcular os níveis de NPSH.

#### **3.3.2.3.7 Lipoperoxidação tecidual (TBARS)**

A determinação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) é utilizada como indicador da peroxidação lipídica. A avaliação da peroxidação lipídica foi realizada segundo o método descrito por Ohkawa e colaboradores (1979), no qual malondialdeído (MDA), um produto final de peroxidação lipídica, reage com o ácido tiobarbitúrico (TBA) para formar um complexo colorido. As amostras foram incubadas a 100 °C durante 60 minutos em meio contendo 0,45 % de SDS e 0,67 % de TBA. Após centrifugação, o produto da reação foi determinado a 532 nm usando MDA como padrão. Os dados foram

expressos como nmol de GSH/mg de proteína e os dados foram expressos como nmol de MDA/mg de proteína.

### **3.3.2.3.8 Dosagem de Proteínas**

O conteúdo de proteínas das amostras foi quantificado pelo método de Lowry e colaboradores (1951), usando albumina de soro bovino como padrão.

### **3.3.2.3.9 Preparação e Incubação das Fatias de Hipocampo**

Os animais foram mortos por decapitação e os hipocampus rapidamente removidos e mantidos em tampão Krebs-Ringer bicarbonato (KRB = NaCl 122 mM; KCl 3 mM; CaCl<sub>2</sub> 1,3 mM; MgSO<sub>4</sub> 1,2 mM; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,4 mM; NaHCO<sub>3</sub> 25 mM; D-glicose 10 mM) gelado e gaseificado com carbogênio (95% O<sub>2</sub> - 5% CO<sub>2</sub>) para atingir o pH 7,4. As fatias (0,4 mm de espessura) foram obtidas utilizando-se um fatiador de tecidos McIlwain (MOLZ et al., 2005).

#### **3.3.2.3.9.1 Incorporação de Iodeto de Propídeo (PI)**

O iodeto de propídeo é um composto polar que entra apenas em células mortas ou com a membrana plasmática danificada. Uma vez dentro das células, o PI complexa-se com o DNA e induz uma intensa fluorescência vermelha (630 nm) que é excitada por luz verde (495 nm) (BOECK et al., 2004). Após o período de 1 hora de pré-incubação as fatias hipocâmpais foram incubadas por 30 minutos com PI (7 µg/ml) à 37° C, sendo em seguida, retirado e substituído por tampão KRB.

### **3.3.2.3.10 Análise estatística para os testes bioquímicos**

As análises estatísticas foram realizadas por meio da análise de variância (ANOVA) de duas vias seguida pelo teste de post hoc Newman-Keuls ( $p < 0,05$ ), utilizando o software Statistica, versão 8.0 (StatSoft, Inc., 2008). Os resultados são expressos como médias  $\pm$  erro padrão da média. Os gráficos foram feitos no programa GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

### 3.4 Resultados

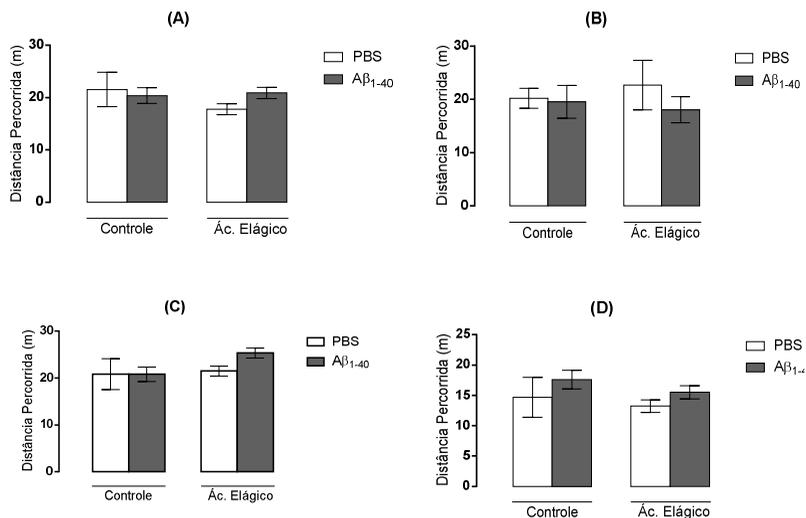
A administração i.c.v. do peptídeo A $\beta$ 1-40 foi utilizada como ferramenta para o estudo da DA (STERU et al., 1985; MEDEIROS et al., 2007; PREDIGER et al., 2007; PIERMARTIRI et al., 2010). Este procedimento induz uma série de alterações (como prejuízos cognitivos e motores, comportamentos do tipo depressivo e ativação de células da glia e reações inflamatórias, perda sináptica e estresse oxidativo) em roedores, muito semelhantes às observadas nesta patologia. Com o presente desenho experimental foi possível administrar o ácido elágico isolado em duas doses (20 e 50 mg/kg) em suspensão contendo 1% de Tween 80 e também contido na nanoemulsão NE<sub>OA</sub> (4%, 0,05mM) (3,37mg/kg) por via oral e a NE<sub>OA</sub> (4%, 0,05mM) (64  $\mu$ g/kg) pela via nasal. Pela via nasal apenas foi possível a administração das nanoemulsões visto a baixa solubilidade do fármaco e as limitações desta via, tanto na utilização de tensoativos como na impossibilidade de administrar suspensões sob risco de asfíxiar o animal.

Os camundongos foram submetidos aos testes do campo aberto, realocação de objeto, suspensão pela cauda, labirinto em cruz elevado e labirinto aquático que avaliam a atividade motora, respostas de emocionalidade e memória espacial dependentes do córtex e hipocampo, bem como marcadores bioquímicos de estresse oxidativo. Os resultados obtidos nestes ensaios são apresentados a seguir.

#### 3.4.1 Testes comportamentais

##### 3.4.1.1 Teste do campo aberto

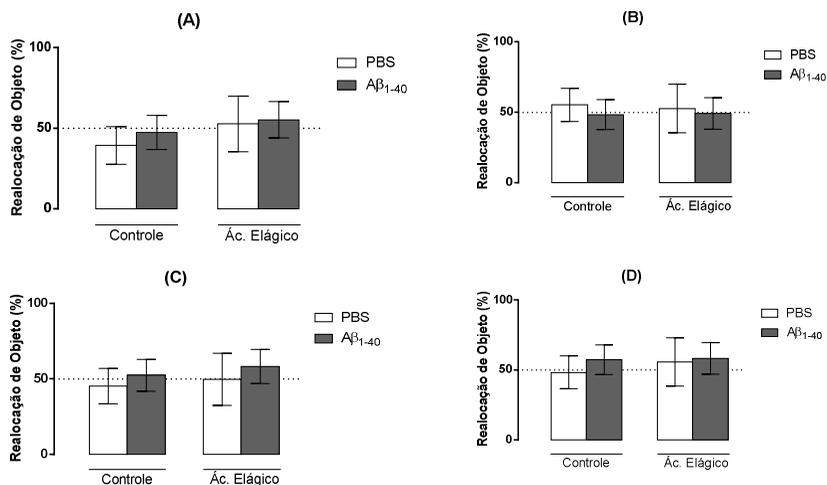
Os resultados do teste do campo aberto são ilustrados na Figura 3.3. Conforme observado, não houve diferença significativa na distância percorrida pelos animais do grupo controle e tratado com ácido elágico por via oral ou nanoemulsão por via oral e intranasal, com ou sem a administração do peptídeo  $\beta$ -amiloide. Este teste demonstrou que a atividade locomotora dos animais não foi alterada em nenhum dos tratamentos realizados. Se houvesse algum dano comprometendo a locomoção dos animais este fator iria influenciar nos testes comportamentais subsequentes.



**Figura 3.3:** Distância percorrida pelos camundongos no teste do campo aberto durante 3 minutos. Onde: (A) dose de 20 mg/kg de AE em suspensão, (B) 50 mg/kg de AE em suspensão, (C) NE<sub>OA</sub> (4%, 0,05mM) (3,37 mg/kg) por via oral e (D) NE<sub>OA</sub> (4%, 0,05mM) (64 µg/kg) pela via nasal. O teste foi avaliado através da análise de variância (ANOVA). As barras representam os valores das médias ± SEM.

### 3.4.1.2 Realocação de objeto

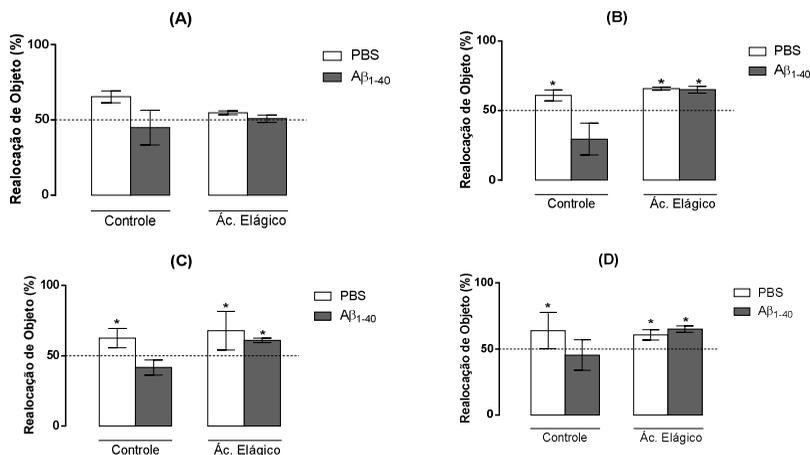
No treinamento dos animais para realização do teste de realocação de objeto, todos os grupos apresentaram desempenho semelhante (Figura 3.4) passando aproximadamente 50% do tempo explorando cada objeto o que indica o interesse dos animais pelos objetos e ausência de preferência por algum deles.



**Figura 3.4:** Tempo de exploração do objeto no treino de realocação de objeto. Onde (A) representa o grupo tratado com AE na dose de 20 mg/kg em suspensão, (B) com 50 mg/kg de AE em suspensão, (C) grupo tratado com a NE<sub>OA</sub> (4%, 0,05mM) via oral (3,37mg/kg) e (D) NE<sub>OA</sub> (4%, 0,05mM) (aproximadamente 64 µg/mL) pela via nasal. O teste foi avaliado através do teste t de student (%50 de investigação no objeto). As barras representam os valores médios ± SEM.

O tratamento de 20 mg/kg de AE não foi capaz de reverter o declínio cognitivo dos animais infundidos com peptídeo β-amilóide humano (Figura 3.5A). No entanto, a administração de AE na dose de 50 mg/kg (Figura 3.5B) por via oral, das nanoemulsões (NE<sub>OA</sub> (4%, 0,05mM)) na dose de 3,37 mg/kg, por via oral e das nanoemulsões (NE<sub>OA</sub> (4%, 0,05mM)) na dose de 64 µg/mL, por via intranasal é possível verificar aumento na função cognitiva de maneira significativa o que comprova que o AE, dependendo da dose e da via administrada consegue reverter o quadro de déficit cognitivo causado pelo peptídeo β-amilóide humano nos animais. Este resultado evidencia uma questão importante da dose, sendo que o AE isoladamente na dose de 20 mg/kg não apresentou efeito sobre a função mnemônica dos animais, sendo esta somente observada na dose de 50 mg/kg. Por outro lado, a administração de nanoemulsões na dose de 3,37 mg/kg (NE<sub>OA</sub> (4%, 0,05mM)) (Figura 3.5C) utilizando a mesma via de administração (oral) já proporcionou efeito significativo, demonstrando uma possibilidade de redução na dose de

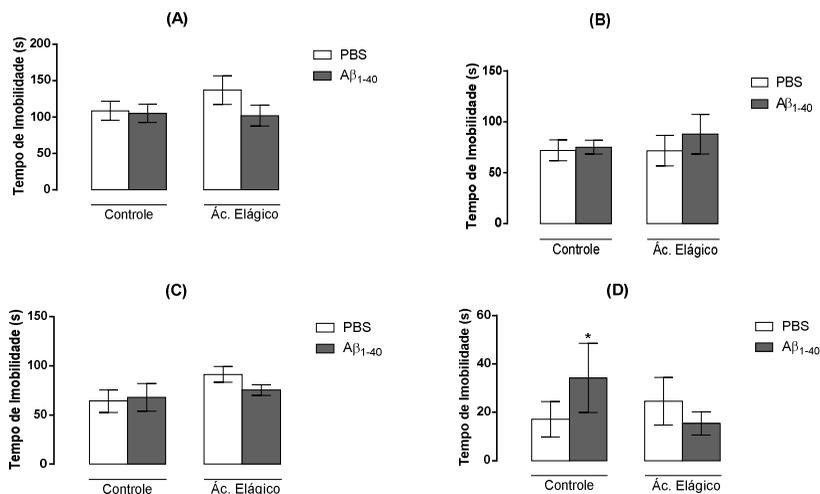
AE em cerca de 10x em relação ao fármaco isoladamente. Para a via nasal, esta redução na dose das nanoemulsões foi ainda mais significativa (cerca de 78x) (aproximadamente 64 µg/mL) (Figura 3.5D), comprovando que com a via de administração também é possível redução na dose, infelizmente por esta via não foi possível a administração do AE isolado por questões de solubilidade como já foi discutido anteriormente. Este efeito tão significativo na redução da dose do AE utilizando nanoemulsões pode ser pelo fato de tais sistemas permitirem a administração de fármacos hidrofóbicos em sistemas dispersos aquosos, o que não ocorreu com o AE isolado que foi administrado em suspensão dificultando sua absorção. Outro fato que pode ter contribuído para a redução da dose nas nanoemulsões é o elevado grau de dispersão dos fármacos contidos nestes sistemas que garante a deposição uniforme nos tecidos oferecendo uma elevada superfície de contato para absorção (BOUCHEMAL et al., 2004; ALMEIDA, TEIXEIRA, KOESTER, 2008). Em relação à via de administração, sabe-se que o AE é semi-impermeável à BHE (TEEL, MARTIN, 1988) e a administração nasal é uma estratégia que pode ser aplicada para contornar a barreira hematoencefálica (PIRES et al., 2009). Este fato pode explicar a redução da dose em cerca de 52x das nanoemulsões pela via nasal. Estratégia semelhante foi utilizada por Jogani e colaboradores (2008), Zhang e colaboradores (2004) e Gao e colaboradores (2007).



**Figura 3.5:** Tempo de exploração do objeto deslocado no teste de realocação de objeto com reexposição de 90 minutos. Onde (A) representa o grupo tratado com AE na dose de 20 mg/kg, (B) com 50 mg/kg (C) grupo tratado com a NE<sub>OA</sub> (4%, 0,05mM) via oral (3,37mg/kg) e (D) NE<sub>OA</sub> (4%, 0,05mM) (aproximadamente 64 µg/mL). O teste foi avaliado através do teste t de student (%50 de investigação objeto realocado). As barras representam as médias ± SEM de 5-7 animais por grupo. O símbolo (\*) representa a análise dos grupo Aβ<sub>1-40</sub>.

### 3.4.1.3 Suspensão pela cauda

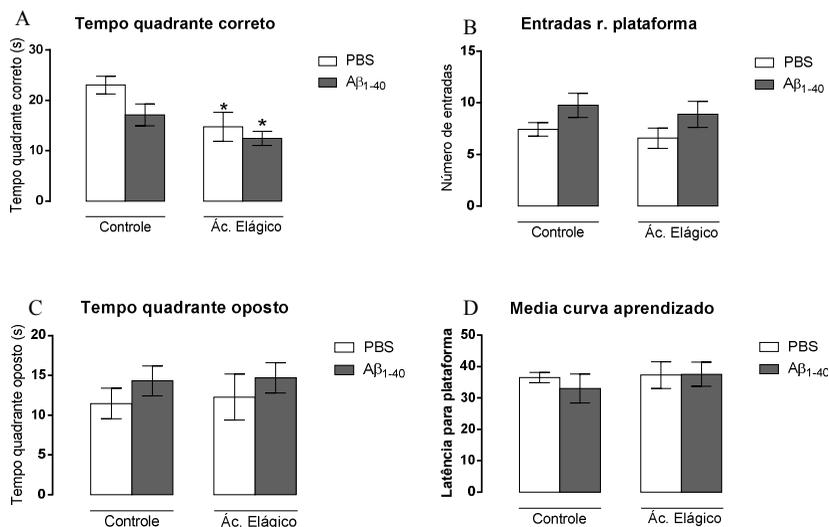
Após a fixação da cauda, os animais foram observados individualmente durante 6 minutos e registrado o tempo total de imobilidade (ausência total de movimentação do animal). Os resultados deste teste estão ilustrados na Figura 3.6. Não foi observada diferença estatística entre os animais que receberam ou não o ácido elálgico por via oral, nas duas doses administradas (20 e 50 mg/kg). Com a administração das NE<sub>OA</sub> (4%, 0,05mM), foi observada diferença estatística quando a administração foi intranasal. Entretanto, os resultados deste experimento podem ter sido comprometidos, pois o tempo de imobilidade foi relativamente menor em todos os animais deste grupo em comparação com as outras formas de administração do ácido elálgico e outras vias de administração.



**Figura 3.6:** Tempo de imobilidade dos camundongos no teste de suspensão pela cauda durante 6 minutos. Onde (A) representa o grupo tratado com AE na dose de 20 mg/kg em suspensão, (B) com 50 mg/kg de AE em suspensão, (C) grupo tratado com a NE<sub>OA</sub> (4%, 0,05mM) via oral (3,37mg/kg) e (D) NE<sub>OA</sub> (4%, 0,05mM) via nasal (aproximadamente 64 µg/mL). O teste foi avaliado através da análise de variância (ANOVA). As barras representam os valores de médias ± SEM.

### 3.4.1.4 Teste do labirinto aquático

Os resultados obtidos no teste do labirinto aquático são ilustrados na figura 3.7. O ácido elálgico foi administrado apenas na dose de 20 mg/kg. Em (A) estão os animais tratados com ácido elálgico onde houve uma redução significativa na permanência no quadrante correto, em contrapartida, os animais tratados com ácido elálgico apresentaram o mesmo número de entradas na zona da plataforma, quando comparado com o grupo não tratado. Estes resultados indicam que no presente estudo não foi possível observar o déficit cognitivo induzido pela infusão do peptídeo β amiloide como previamente descrito na literatura.

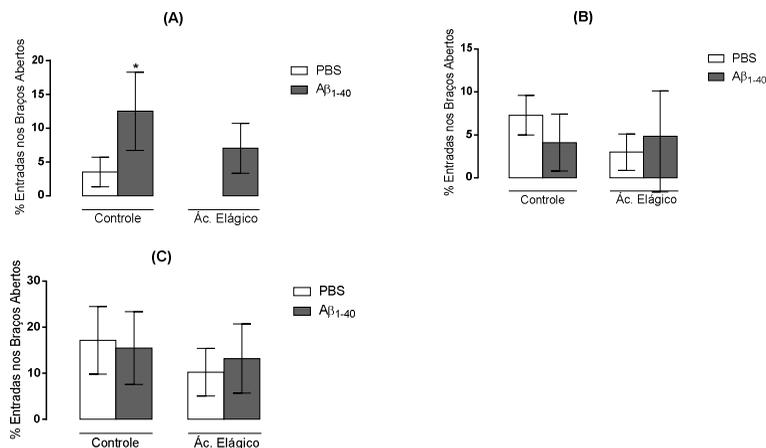


**Figura 3.7:** Representa informações sobre o teste do labirinto aquático, onde (A) representa o tempo em que o animal permaneceu no quadrante correto, (B) denota o número de entradas na plataforma, (C) o tempo gasto pelo animal no quadrante oposto ao correto, (D) média da latência dos animais frente ao treino. O teste foi avaliado através da análise de variância (ANOVA). As barras representam os valores de médias  $\pm$  SEM.

### 3.4.1.5 Labirinto em cruz elevado

Um dos modelos mais amplamente utilizados na análise da ansiedade em ratos e camundongos é o labirinto em cruz elevado, que é baseado em respostas condicionadas a ambientes potencialmente perigosos. O teste baseia-se na premissa que ambientes novos evocam curiosidade e medo, criando desta forma, um típico conflito de aproximação/esquiva (LISTER, 1987). Os padrões comportamentais observados representam uma análise de combinação de atividades exploratórias, movimentos de esquiva e comportamento motor de forma geral. Neste teste, o comportamento natural dos camundongos é permanecer mais tempo na parte do labirinto dos braços fechados, pois há diminuição da luminosidade e proteção contra a queda. A avaliação

no teste do labirinto em cruz elevado foi realizada com a administração de 50 mg/kg de AE por via oral, com a NE<sub>OA</sub> (4%, 0,05mM) via oral (3,37 mg/kg) e NE<sub>OA</sub> (4%, 0,05mM) via intranasal (aproximadamente 64 µg/mL) e os resultados são ilustrados na Figura 3.8.



**Figura 3.8:** Percentual de entradas nos braços abertos no teste do labirinto em cruz elevado, onde (A) administração de AE dose de 50 mg/kg em suspensão, (B) grupo tratado com a NE<sub>OA</sub> (4%, 0,05mM) via oral (3,37 mg/kg) e (C) NE<sub>OA</sub> (4%, 0,05mM) via nasal (aproximadamente 64 µg/mL). O teste foi avaliado através da análise de variância (ANOVA). As barras representam os valores médios ± SEM.

No grupo que recebeu a infusão de Aβ<sub>1-40</sub>, houve maior permanência nos braços abertos do aparato, considerados mais aversivos, que pode indicar um prejuízo na avaliação de risco no labirinto em cruz elevado. Este comportamento foi revertido com a administração de AE na dose de 50 mg/kg. Este efeito não foi observado na administração das NE<sub>OA</sub> (4%, 0,05mM), nas duas vias testadas haja vista que não houve diferença entre o grupo tratado e o grupo controle.

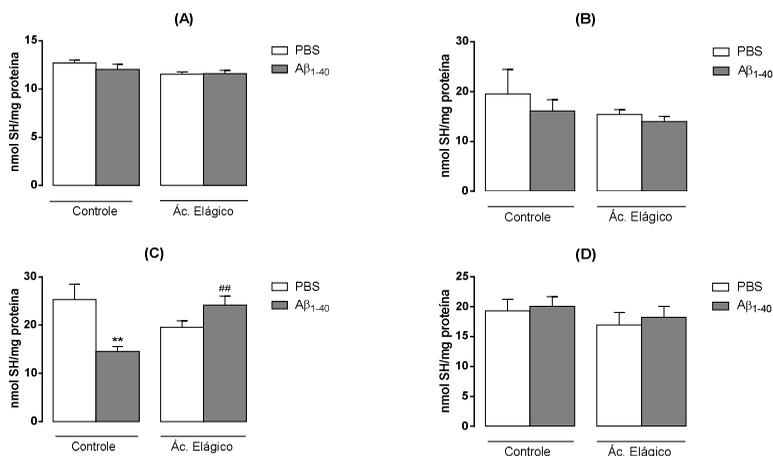
### 3.4.2 Marcadores bioquímicos de estresse oxidativo

Há relatos na literatura da atividade antioxidante do AE (COZZI et al., 1995; WILSON, MICKLEY, MATERA, 2010) que

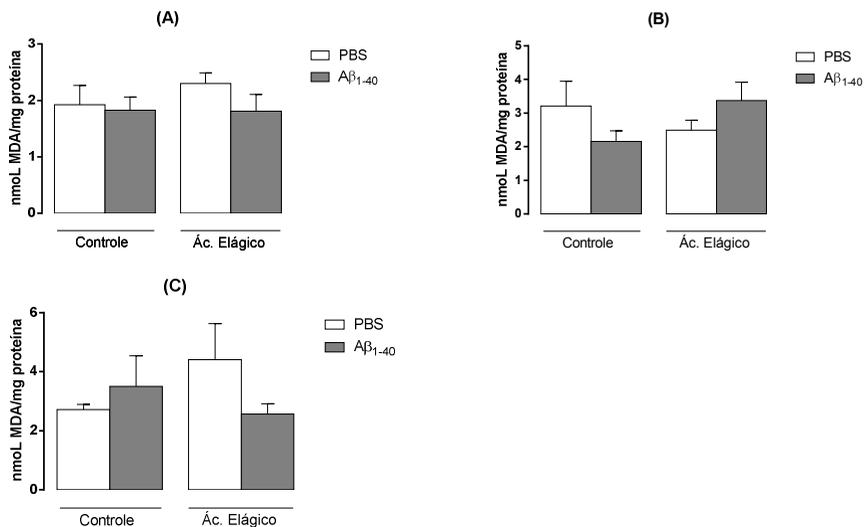
também foi comprovada *in vitro* através do ensaio de DPPH, portanto, após a realização do último teste comportamental foram avaliados alguns marcadores bioquímicos de estresse oxidativo tais como: níveis de tióis não protéicos (NPSH), atividade das enzimas glutatona redutase (GR), glutatona peroxidase (GPx), catalase (CAT) e acetilcolinesterase (Ache) e níveis de lipoperoxidação tecidual (TBARS) em córtex pré-frontal e hipocampo dos animais.

O sistema antioxidante da glutatona é essencial para a proteção do CNS contra diversas moléculas oxidantes (DRINGEN, HIRRLINGER, 2003) e estudos de um grupo de pesquisa da UFSC (MEDEIROS et al., 2007; PREDIGER et al., 2007) demonstram que a infusão do peptídeo  $A\beta_{1-40}$  diminui esta defesa antioxidante fisiológica, alterando o estado redox celular. Os resultados do presente estudo reforçam estes achados em relação à concentração de tióis não protéicos (NPSH) que determina principalmente os níveis de glutatona reduzida (GSH), ilustrados na figura 3.9, que demonstram que houve alteração significativa no córtex pré-frontal de camundongos submetidos à infusão do peptídeo  $A\beta_{1-40}$  e que o tratamento com ácido elágico foi capaz de prevenir este efeito apenas quando administrado na forma de nanoemulsões pela via oral (Figura 3.9 C) ( $F_{1,19} = 15,13$ ,  $p=0,0009$ ). Os resultados da Figura 3.9 indicam um possível efeito antioxidante do AE, que pode estar associado a proteção contra a diminuição dos níveis de NPSH no córtex pré-frontal dos camundongos.

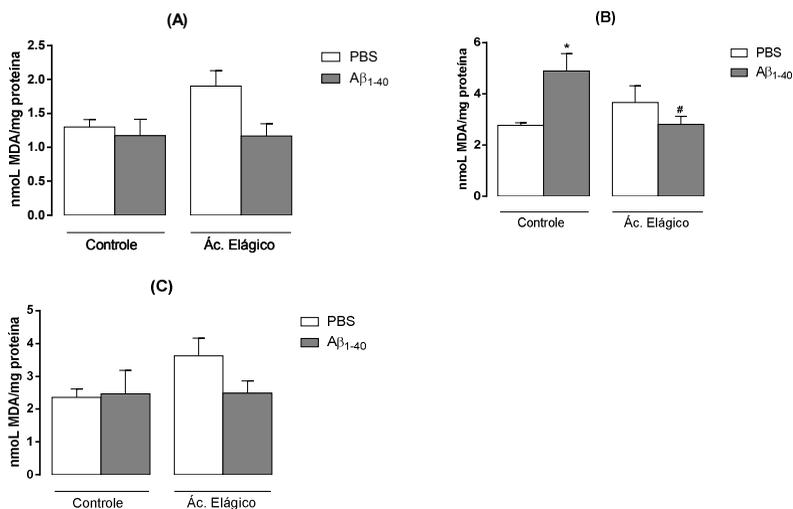
Com relação à lipoperoxidação, avaliada através do ensaio de TBARS, nenhuma alteração foi identificada no córtex pré-frontal conforme demonstrado na figura 30, por outro lado, no grupo tratado com a nanoemulsão por via oral, o AE conseguiu prevenir o estresse oxidativo causado no hipocampo (figura 3.10) pela infusão do peptídeo  $A\beta_{1-40}$  ( $F_{1,19} = 7,98$ ,  $p=0,0127$ ).



**Figura 3.9:** Ensaio dos tióis não protéicos expresso em nmol de GSH/mg de proteína no córtex pré-frontal de camundongos onde (A) representa o grupo tratado com AE na dose de 20 mg/kg, (B) com 50 mg/kg, (C) grupo tratado com a NE<sub>OA</sub> (4%, 0,05mM) via oral (3,37mg/kg) e (D) NE<sub>OA</sub> (4%, 0,05mM) via nasal (aproximadamente 64 µg/mL). O teste foi avaliado através da análise de variância (ANOVA). As barras representam as médias ± SEM de 5-7 animais por grupo. O símbolo (\*) representa a análise entre o grupo PBS e Aβ<sub>1-40</sub>, enquanto que o símbolo (#) representa a análise entre os grupos AE + Aβ<sub>1-40</sub> e Aβ<sub>1-40</sub>.



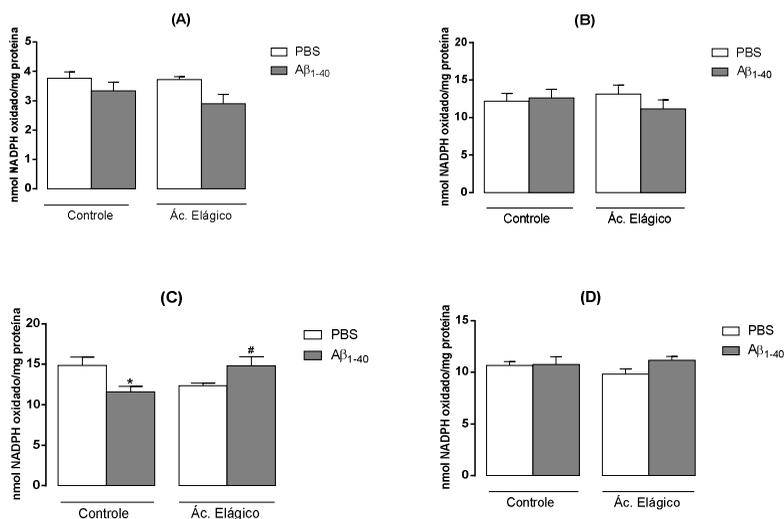
**Figura 3.10:** Ensaio para quantificação dos níveis de lipoperoxidação tecidual (TBARS) no córtex pré-frontal de camundongos expresso em nmol de malondealdeído/mg de proteína onde (A) representa o grupo tratado com 50 mg/kg, (B) grupo tratado com a NE<sub>OA</sub> (4%, 0,05mM) via oral (3,37mg/kg) e (C) NE<sub>OA</sub> (4%, 0,05mM) via nasal (aproximadamente 64  $\mu$ g/mL). O teste foi avaliado através da análise de variância (ANOVA). As barras representam as médias  $\pm$  SEM de 5-7 animais por grupo.



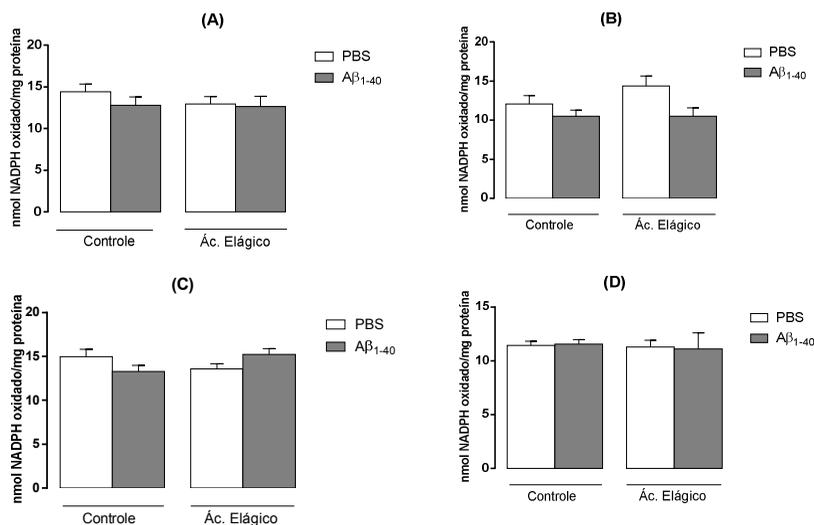
**Figura 3.11:** Ensaio para quantificação dos níveis de lipoperoxidação tecidual (TBARS) no hipocampo de camundongos expresso em nmol de malondealdeído/mg de proteína onde (A) representa o grupo tratado com 50 mg/kg, (B) grupo tratado com a NE<sub>OA</sub> (4%, 0,05mM) via oral (3,37mg/kg) e (C) NE<sub>OA</sub> (4%, 0,05mM) via nasal (aproximadamente 64 µg/mL). O teste foi avaliado através da análise de variância (ANOVA). As barras representam as médias ± SEM de 5-7 animais por grupo. O símbolo (\*) representa a análise entre o grupo PBS e Aβ<sub>1-40</sub>, enquanto que o símbolo (#) representa a análise entre os grupos AE + Aβ<sub>1-40</sub> e Aβ<sub>1-40</sub>.

Para o ensaio da atividade da enzima glutatona redutase também no córtex pré-frontal de camundongos (Figura 3.12) apenas foi observada diferença significativa ( $F_{1,19} = 10,84$ ,  $p = 0,004$ ) no grupo tratado com a nanoemulsão por via oral (Figura 3.12C) confirmando o resultado obtido com os tióis não protéicos. Ou seja, neste grupo, o peptídeo Aβ<sub>1-40</sub> reduziu significativamente a atividade da enzima GR no córtex pré-frontal dos animais. Esta enzima é responsável pela manutenção da glutatona na sua forma reduzida, sendo considerado um sistema de defesa antioxidante. Já o tratamento com o AE contido nas nanoemulsões por via oral preveniu a redução da atividade desta enzima, exercendo ação neuroprotetora. A atividade desta mesma enzima não sofreu alteração significativa nos outros grupos de

tratamento com o AE. No hipocampo de camundongos infundidos com o peptídeo  $A\beta_{1-40}$  o ensaio de quantificação da enzima glutaciona redutase (Figura 3.13) não demonstrou alteração significativa em nenhum dos grupos tratados. Santos e colaboradores (2013) avaliaram o efeito do neuropeptídeo Y frente aos efeitos neurotóxicos da infusão de  $A\beta_{1-40}$  em camundongos. Os resultados obtidos pelos autores demonstram alteração da enzima glutaciona redutase no córtex pré-frontal e não no hipocampo dos animais infundidos com o peptídeo, resultado este muito semelhante ao obtido neste trabalho. Já em outro estudo, Santos e colaboradores (2012) não identificaram diferenças significativas deste mesma enzima em nenhum das estruturas avaliadas.

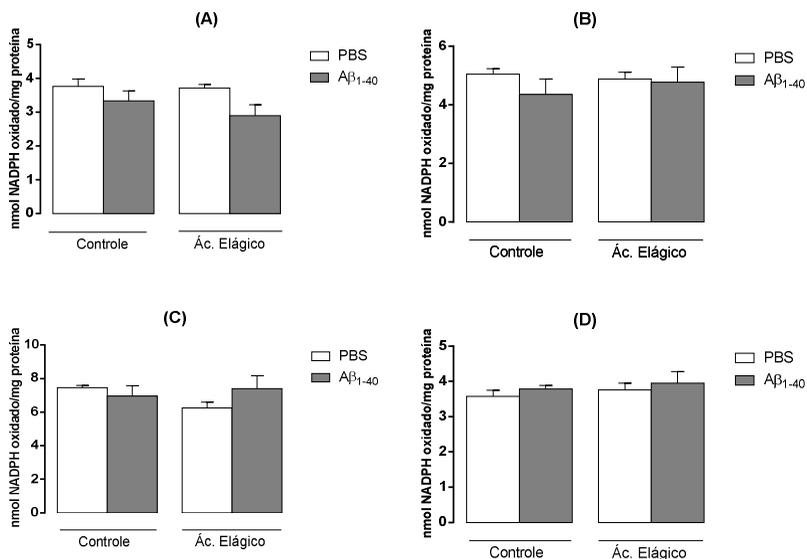


**Figura 3.12:** Ensaio para quantificação da enzima glutaciona redutase no córtex pré-frontal de camundongos expresso em nmol de NADPH oxidado/minuto/mg de proteína onde (A) representa o grupo tratado com AE na dose de 20 mg/kg de AE em suspensão por via oral, (B) com 50 mg/kg de AE em suspensão por via oral, (C) grupo tratado com a  $NE_{OA}$  (4%, 0,05mM) via oral (3,37 mg/kg) e (D)  $NE_{OA}$  (4%, 0,05mM) via nasal (aproximadamente 64  $\mu$ g/mL). O teste foi avaliado através da análise de variância (ANOVA). As barras representam as médias  $\pm$  SEM de 5-7 animais por grupo. O símbolo (\*) representa a análise entre o grupo PBS e  $A\beta_{1-40}$ , enquanto que o símbolo (#) representa a análise entre os grupos AE +  $A\beta_{1-40}$  e  $A\beta_{1-40}$ .

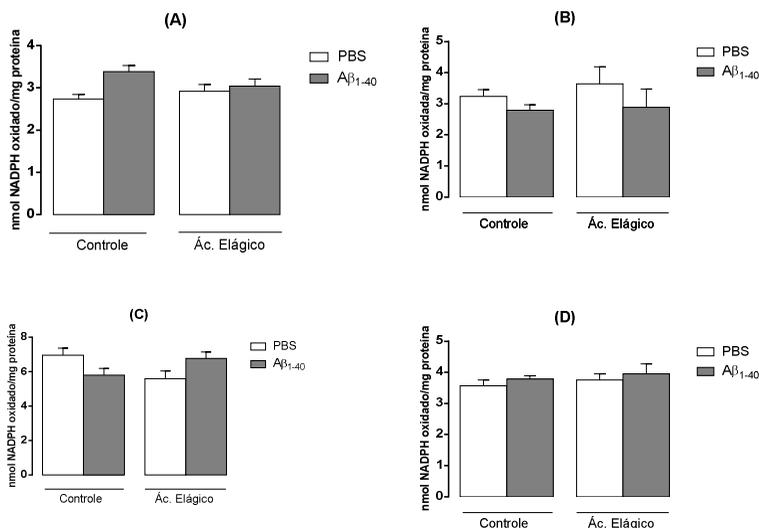


**Figura 3.13:** Ensaio para quantificação da enzima glutationa redutase no hipocampo de camundongos expresso em nmol de NADPH oxidado/minuto/mg de proteína onde (A) representa o grupo tratado com AE na dose de 20 mg/kg de AE em suspensão por via oral, (B) com 50 mg/kg de AE em suspensão por via oral, (C) grupo tratado com a NE<sub>OA</sub> (4%, 0,05mM) via oral (3,37mg/kg) e (D) NE<sub>OA</sub> (4%, 0,05mM) via nasal (aproximadamente 64 µg/mL). O teste foi avaliado através da análise de variância (ANOVA). As barras representam as médias ± SEM de 5-7 animais por grupo.

A infusão do peptídeo Aβ<sub>1-40</sub> e o tratamento com o AE em todas as concentrações e vias utilizadas não alteraram a atividade da enzima glutationa peroxidase tanto no córtex pré-frontal quanto no hipocampo, conforme ilustrado nas Figuras 3.14 e 3.15, respectivamente. Resultado semelhante foi previamente descrito por Santos e colaboradores (2012) com a infusão da mesma dose do peptídeo Aβ<sub>1-40</sub> em camundongos.

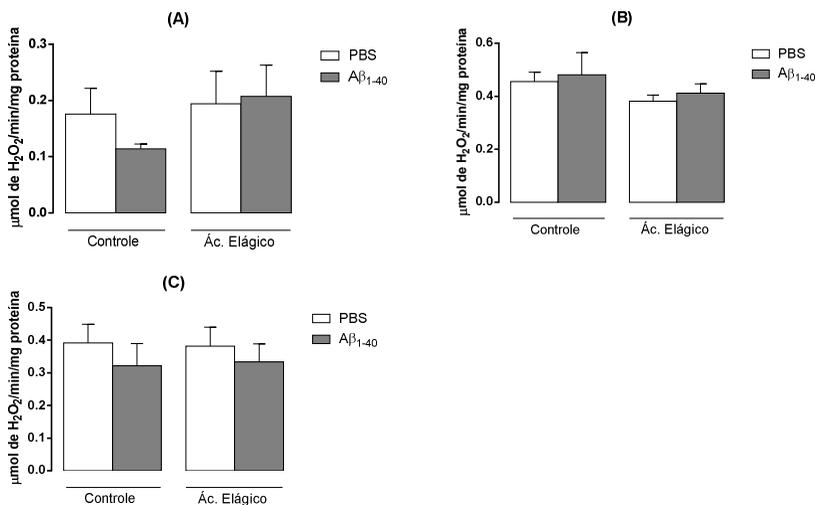


**Figura 3.14:** Ensaio para determinação da atividade da enzima glutatona peroxidase no córtex pré-frontal de camundongos expresso em nmol de NADPH oxidado/minuto/mg de proteína onde onde (A) representa o grupo tratado com AE na dose de 20 mg/kg em suspensão por via oral, (B) com 50 mg/kg de AE em suspensão por via oral, (C) grupo tratado com a NE<sub>OA</sub> (4%, 0,05mM) via oral (3,37mg/kg) e (D) NE<sub>OA</sub> (4%, 0,05mM) via nasal (aproximadamente 64 µg/mL). O teste foi avaliado através da análise de variância (ANOVA). As barras representam as médias ± SEM de 5-7 animais por grupo.

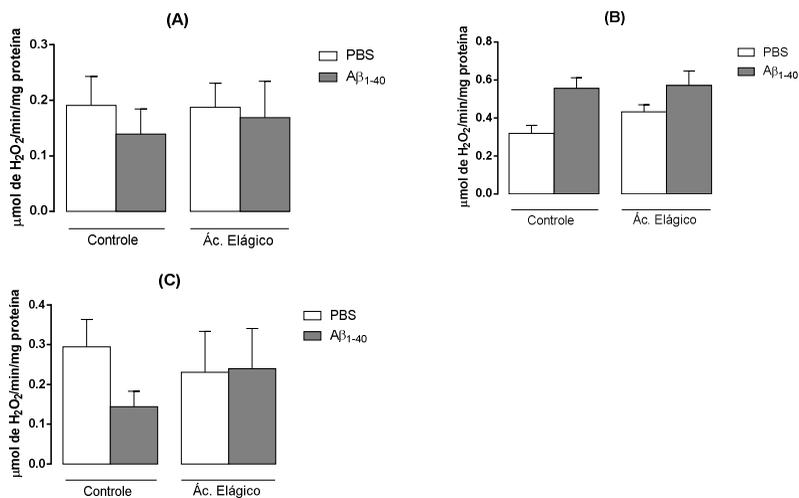


**Figura 3.15:** Ensaio para determinação da atividade da enzima glutatona peroxidase no hipocampo de camundongos expresso em nmol de NADPH oxidado/minuto/mg de proteína onde onde (A) representa o grupo tratado com AE na dose de 20 mg/kg em suspensão por via oral, (B) com 50 mg/kg de AE em suspensão por via oral, (C) grupo tratado com a NE<sub>OA</sub> (4%, 0,05mM) via oral (3,37mg/kg) e (D) NE<sub>OA</sub> (4%, 0,05mM) via nasal (aproximadamente 64 μg/mL). O teste foi avaliado através da análise de variância (ANOVA). As barras representam as médias ± SEM de 5-7 animais por grupo.

A atividade da enzima catalase não sofreu alterações significativas com a infusão do peptídeo Aβ<sub>1-40</sub> e nem com o tratamento com o AE em nenhuma das concentrações e vias de administração utilizadas, tanto no córtex pré-frontal (Figura 3.16) quanto no hipocampo (Figura 3.17).

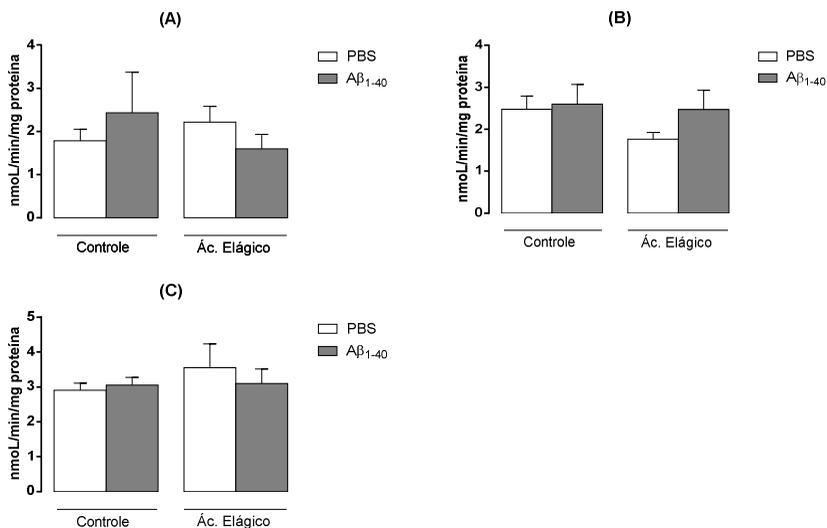


**Figura 3.16:** Ensaio para determinação da atividade da enzima catalase no córtex pré-frontal de camundongos expresso em µmol de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> /minuto/mg de proteína onde (A) representa o grupo tratado com AE na dose de 50 mg/kg em suspensão por via oral, (B) grupo tratado com a NE<sub>OA</sub> (4%, 0,05mM) via oral (3,37 mg/kg) e (C) NE<sub>OA</sub> (4%, 0,05mM) via nasal (aproximadamente 64 µg/mL). O teste foi avaliado através da análise de variância (ANOVA). As barras representam as médias ± SEM de 5-7 animais por grupo.

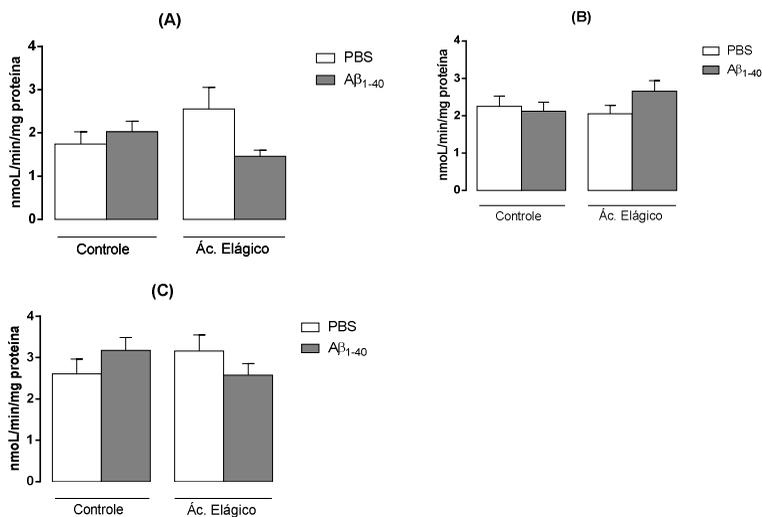


**Figura 3.17:** Ensaio para determinação da atividade da enzima catalase no hipocampo de camundongos expresso em  $\mu\text{mol de H}_2\text{O}_2/\text{minuto/mg}$  de proteína onde (A) representa o grupo tratado com AE na dose de 50 mg/kg em suspensão por via oral, (B) grupo tratado com a  $\text{NE}_{\text{OA}}$  (4%, 0,05mM) via oral (3,37 mg/kg) e (C)  $\text{NE}_{\text{OA}}$  (4%, 0,05mM) via nasal (aproximadamente 64  $\mu\text{g/mL}$ ). O teste foi avaliado através da análise de variância (ANOVA). As barras representam as médias  $\pm$  SEM de 5-7 animais por grupo. O símbolo (\*) representa a análise entre o grupo PBS e  $A\beta_{1-40}$ , enquanto que o símbolo (#) representa a análise entre os grupos AE +  $A\beta_{1-40}$  e  $A\beta_{1-40}$ .

Estudos recentes (WILSON, MICKLEY, MATERA, 2010; SANTOS et al., 2012) demonstraram alterações na enzima acetilcolinesterase com a infusão do peptídeo  $A\beta_{1-40}$ , resultado este que não foi possível verificar neste trabalho, pois não houve alterações significativas desta enzima no córtex pré-frontal e no hipocampo com a infusão do peptídeo e tampouco com os tratamentos utilizando o AE em nenhuma das concentrações e vias utilizadas, conforme ilustrado nas Figuras 3.18 e 3.19, respectivamente.

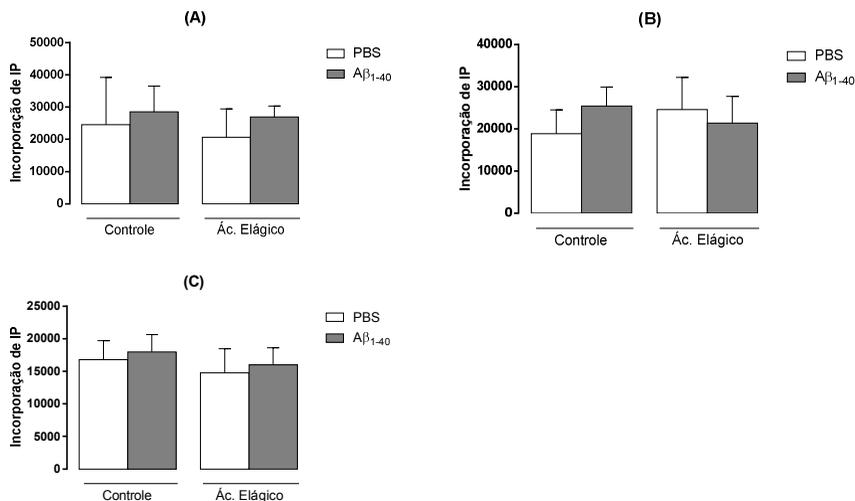


**Figura 3.18:** Ensaio para quantificação da enzima acetilcolinesterase no córtex pré-frontal de camundongos expresso em nmol/minuto/mg de proteína onde (A) representa o grupo tratado com 50 mg/kg, (B) grupo tratado com a NE<sub>OA</sub> (4%, 0,05mM) via oral (3,37 mg/kg) e (C) NE<sub>OA</sub> (4%, 0,05mM) via nasal (aproximadamente 64 μg/mL). O teste foi avaliado através da análise de variância (ANOVA). As barras representam as médias ± SEM de 5-7 animais por grupo.



**Figura 3.19:** Ensaio para quantificação da enzima acetilcolinesterase no hipocampo de camundongos expresso em nmol/minuto/mg de proteína onde (A) representa o grupo tratado com 50 mg/kg, (B) grupo tratado com a NE<sub>OA</sub> (4%, 0,05mM) via oral (3,37 mg/kg) e (C) NE<sub>OA</sub> (4%, 0,05mM) via nasal (aproximadamente 64 µg/mL). O teste foi avaliado através da análise de variância (ANOVA). As barras representam as médias ± SEM de 5-7 animais por grupo.

O ensaio de incorporação de iodeto de propídeo foi realizado em fatias de hipocampo de camundongos para avaliar a morte neuronal após 14 dias da infusão do peptídeo Aβ<sub>1-40</sub>. Os resultados deste ensaio estão demonstrados na Figura 3.20 e após este período não foi possível identificar diferenças estatísticas entre o grupo infundido com o peptídeo e os grupos controle em nenhuma das concentrações de AE e vias de administração relatadas.



**Figura 3.20:** Incorporação de Iodeto de propídeo em fatias de hipocampo de camundongos expresso em incorporação de iodeto de propídeo onde (A) representa o grupo tratado com 50 mg/kg, (B) grupo tratado com a NE<sub>OA</sub> (4%, 0,05mM) via oral (3,37mg/kg) e (C) NE<sub>OA</sub> (4%, 0,05mM) via nasal (aproximadamente 64 µg/mL). O teste foi avaliado através da análise de variância (ANOVA). As barras representam as médias ± SEM de 5-7 animais por grupo.

A administração do AE isolado e contido nas nanoemulsões em camundongos demonstrou baixa toxicidade, pois nenhum animal foi a óbito durante o experimento e tampouco houve alteração do peso corpóreo significativa em nenhuma das concentrações de AE e vias de administração utilizadas.

A infusão intracerebroventricular do peptídeo Aβ<sub>1-40</sub> causou déficit cognitivo nos animais conforme demonstrado no teste comportamental de realocação de objeto, apesar de não terem sido detectadas discretas alterações em marcadores bioquímicos de estresse oxidativo. Apenas no protocolo com o grupo de animais com a administração da NE por via oral foi possível observar o estresse oxidativo proporcionado pelo peptídeo. Nesse grupo, houve aumento de TBARS e na GR e diminuição de NPSH, todos identificados no córtex, demonstrando o desequilíbrio oxidativo deste tecido que em todos os casos foi revertido pelo AE. A diminuição da peroxidação lipídica

observada pelo tratamento com o AE nanoemulsionado por via oral, pode estar relacionado à capacidade antioxidante do fármaco (COZZI et al., 1995; SHARMA et al., 2007). Além da ação antioxidante outros mecanismos podem estar envolvidos com o efeito neuroprotetor do AE, como por exemplo, antiinflamatório (ROGERIO et al., 2006; YANG et al., 2008) e/ou antiamiladogênico (FENG et al., 2009).

Há trabalhos na literatura relatando a utilização deste modelo de Alzheimer em camundongos (PREDIGER et al., 2007; WILSON, MICKLEY, MATERA, 2010; SANTOS et al., 2012; SANTOS et al., 2013) e alguns resultados de marcadores bioquímicos de estresse oxidativo são contraditórios, assim, pode-se sugerir que este modelo tem muitos interferentes, como o local da administração, o tipo de peptídeo infundido, o procedimento para infusão, o tempo entre a infusão e a realização dos ensaios, etc... Mesmo utilizando o mesmo protocolo, é possível obter resultados diferentes provavelmente resultantes de um estado muito dinâmico destes tipos de marcadores enzimáticos.

Apesar dos marcadores de estresse oxidativo apresentarem resultados diferentes, os resultados comportamentais foram muito semelhantes para os grupos avaliados. Todos os grupos demonstram que a infusão do peptídeo  $A\beta_{1-40}$  não apresentou nenhum tipo de dano motor, proporcionando a realização dos demais testes comportamentais e que há um déficit cognitivo demonstrado pela capacidade mnemônica dos animais no teste de realocação de objeto.

O tratamento com 20 mg/kg de AE não foi capaz de reverter o declínio cognitivo dos animais infundidos com peptídeo  $A\beta_{1-40}$ . No entanto, a administração de AE na dose de 50mg/kg por via oral, das nanoemulsões ( $NE_{OA}$  (4%, 0,05mM)) na dose de 3,37mg/kg, por via oral, e das nanoemulsões ( $NE_{OA}$  (4%, 0,05mM)) na dose de 64  $\mu$ g/mL, por via nasal, é possível verificar melhora na função cognitiva de maneira significativa. Este resultado demonstra diminuição da dose terapêutica cerca de 750 vezes se compararmos a via oral do fármaco isolado e a via nasal nas nanoemulsões e de aproximadamente 14 vezes se relacionarmos a via oral do fármaco isolado e a via oral nas nanoemulsões. Esta diminuição considerável na dose aliado ao fato de que a NE proporcionou a administração do AE por via nasal (visto que por problemas de solubilidade o fármaco isolado não foi administrado por via nasal) justifica o desenvolvimento das nanoemulsões contendo o AE.

Os resultados sugerem que as nanoemulsões mucoadesivas desenvolvidas são um veículo interessante de administração do AE, fármaco este que apresenta potencial terapêutico para amenizar a progressão da doença de Alzheimer, devido aos resultados obtidos principalmente em relação à capacidade mnemônica dos animais nos testes comportamentais. Além disso, a via de administração nasal tornou ser possível uma diminuição considerável da dose comprovando ser uma estratégia para contornar a barreira hematoencefálica, a qual é altamente seletiva a maioria das substâncias, impedindo o alcance de fármacos no sistema nervoso central (PIRES et al., 2009).

---

---

CONCLUSÕES PARCIAIS

---

---

- A infusão intracerebroventricular do peptídeo  $A\beta_{1-40}$  causou déficit cognitivo nos animais conforme demonstrado no teste comportamental de realocação de objeto apesar de não serem detectadas alterações em marcadores bioquímicos de estresse oxidativo. Apenas no protocolo com o grupo de animais com a administração da NE por via oral foi possível observar o estresse oxidativo proporcionado pelo peptídeo. Nesse grupo, houve aumento de TBARS e na GR e diminuição de NPSH, todos identificados no córtex, demonstrando o desequilíbrio oxidativo deste tecido, que em todos os casos foi revertido pelo AE.
- O tratamento com 20 mg/kg de AE não foi capaz de reverter o declínio cognitivo dos animais infundidos com peptídeo  $A\beta_{1-40}$ . No entanto, com a administração de AE na dose de 50mg/kg por via oral, das nanoemulsões ( $NE_{OA}$  (4%, 0,05mM)) na dose de 3,37mg/kg, por via oral e das nanoemulsões ( $NE_{OA}$  (4%, 0,05mM)) na dose de 64  $\mu$ g/mL, por via nasal, foi possível verificar melhora na função cognitiva de maneira significativa. Esta diminuição considerável na dose aliado ao fato de que a NE proporcionou a administração do AE por via nasal (visto que por problemas de solubilidade o fármaco isolado não foi administrado por via nasal) justificam o desenvolvimento das nanoemulsões contendo o AE.
- Os resultados sugerem que as nanoemulsões mucoadesivas desenvolvidas são um veículo interessante de administração do AE, fármaco este que apresenta potencial terapêutico para amenizar a progressão da doença de Alzheimer, devido aos resultados obtidos principalmente em relação à capacidade mnemônica dos animais nos testes comportamentais.

---

---

**CAPÍTULO 4: DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO E  
INCORPORAÇÃO DO ÁCIDO ELÁGICO EM SISTEMAS  
NANOESTRUTURADOS A PARTIR DE MISTURAS  
TERNÁRIAS DE OLEILAMINA/PPG-5-CETETH-20/ÁGUA**

---

---

## 4.1 Introdução

Cristais líquidos (CL) constituem uma fase distinta de estruturas condensadas, cujas características físicas os posicionam entre sólidos e líquidos, com parcial ordem/desordem. Por essa razão, são também chamados de mesofases, em que o prefixo grego *meso* significa intermediário. Materiais que formam cristais líquidos pela adição de solventes são chamados cristais líquidos liotrópicos, enquanto cristais líquidos termotrópicos têm sua estabilidade dependente da temperatura (HOLMBERG, 2001).

Sistemas de cristais líquidos liotrópicos são constituídos de moléculas anfifílicas e podem ser classificadas em mesofases lamelares, cúbicas e hexagonais. Fases lamelares são formadas por camadas paralelas e planares de bicamadas de tensoativos separadas por camadas de solvente, formando uma rede unidimensional. As fases hexagonais são constituídas por arranjos cilíndricos longos, formando estruturas bidimensionais. Nos sistemas de fase cúbica, as moléculas estão arranjadas em bicamadas lipídicas contínuas curvas, numa estrutura tridimensional, interpenetradas por dois canais aquosos que não entram em contato entre si (DEMUS et al., 1998; GUO et al., 2010).

Sistemas de cristais líquidos têm ganhado muita atenção devido ao seu grande potencial em atuar como veículos para fármacos, por diferentes vias de administração. Além disso, materiais que formam cristais líquidos que apresentam pelo menos dois grupamentos hidroxila (ex. monooleato de glicerila) são capazes de interagir com o muco que reveste as mucosas por meio de ligações de hidrogênio sendo, portanto, bons candidatos para a liberação transmucosal de fármacos. Entretanto, para facilitar a administração, sistemas precursores de cristais líquidos são empregados. Tais sistemas exibem baixa viscosidade, mas podem formar hidrogéis viscosos, após absorção de líquidos corporais *in vivo*. Tais sistemas foram testados, por exemplo, para a liberação vaginal do bromidrato de propantelina e liberação bucal de encefalina (DEMUS et al., 1998; GUO et al., 2010).

Recentemente, Carvalho e colaboradores (2013) desenvolveram um sistema precursor de cristal líquido (SPCL), com propriedades mucoadesivas, para a liberação da zidovudina (AZT) por via nasal, constituído por uma mistura de PPG-5-CETETH-20, ácido oleico e água

(55:30:15; m/m). Este sistema demonstrou comportamento de fluxo newtoniano e isotropia, entretanto, após diluição com muco nasal artificial na proporção de 1:1 (p/p), ele sofre uma mudança para uma fase lamelar anisotrópica. A análise da força mucoadesiva em texturômetro, usando como substrato a mucosa nasal suína ou um disco de mucina, provou que a transição para a fase lamelar triplica o trabalho de mucoadesão. Estudos de permeação utilizando células do tipo Franz e mucosa nasal suína como modelo de membrana mostraram um aumento de 18 vezes na permeabilidade do AZT, quando o SPCL é comparado com uma solução do fármaco. Estudos farmacocinéticos evidenciaram que a absorção do AZT pela via nasal, após administração do SPCL, é rápida ( $T_{max}$  de 6,7 min). Assim, considerando o efeito mucoadesivo e promotor de absorção do SPCL, os autores concluíram que este sistema constitui uma estratégia promissora para a liberação sistêmica de AZT e outros antirretrovirais pela via nasal.

Com base nesses resultados, esse capítulo aborda o desenvolvimento de SPCL a partir de misturas de PPG-5-CETETH-20, oleilamina e água, para veiculação de fármacos pela via nasal. Estes estudos foram realizados mediante a construção de um diagrama de fases ternário para determinação da região de formação de SPCL. Os sistemas obtidos foram caracterizados por microscopia de luz polarizada, espectroscopia de absorção no infravermelho, avaliação do perfil de textura (TPA) em contato com fluido nasal simulado (FNS) ou água, determinação da força mucoadesiva, e ensaios reológicos. Com o presente estudo pretende-se, portanto, propor uma outra forma alternativa para administração nasal do AE para liberação no SNC.

## **4.2 Materiais**

### **4.2.1 Materiais**

- Mucina tipo II crua de estômago suíno (Sigma-Aldrich, EUA)
- Oleilamina (Sigma-Aldrich, EUA)
- Álcool cetílico etoxilado (20 OE) e propoxilado (5 OP), PPG-5-CETETH-20, Procetyl® (CRODA)

### **4.2.2 Solventes e reagentes**

- Hidróxido de sódio (Cromoline, São Paulo)
- Cloreto de sódio (Synth, Brasil)
- Cloreto de potássio (Synth, Brasil)
- Cloreto de cálcio dihidratado (Synth, Brasil)

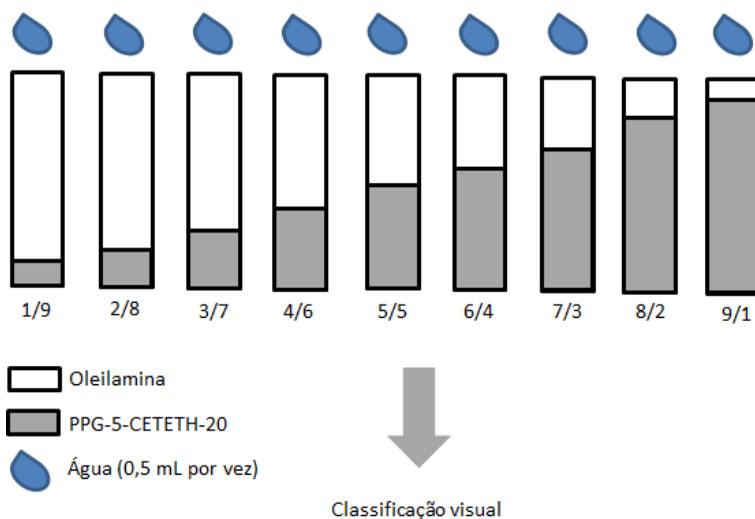
### **4.2.3 Equipamentos**

- Analisador de textura TA-XTplus, Stable Micro System® (Reino Unido);
- Balança digital Ohaus;
- Banho de ultrassom, Branson, modelo 1210;
- Homogeneizador de tubos, modelo AP22, Phoenix;
- Microscópio de luz polarizada Axioskop 40, Carl Zeiss, (Gottingen, Alemanha)
- Viscosímetro rotacional HAAKE k10, VT 550;

## 4.3 Metodologia

### 4.3.1 Construção do diagrama de fases ternário do sistema contendo PPG-5-CETETH-20, oleilamina (OA) e água

O diagrama de fase ternário foi obtido pela titulação aquosa de misturas do tensoativo (PPG-5-CETETH-20) e o lipídeo catiônico (oleilamina) nas proporções de 1:9, 2:8, 3:7, 4:6, 5:5, 6:4, 7:3, 8:2 e 9:1, conforme representado na Figura 4.1. Para cada etapa foi adicionado 500  $\mu\text{L}$  de água purificada, paulatinamente, com auxílio de uma micropipeta. Após cada adição, os sistemas foram homogeneizados com auxílio de banho de ultrassom por 5 minutos e mantidos em repouso por 24 horas. As mudanças de fases foram identificadas visualmente e classificadas como separação de fases (SF), sistema líquido transparente (SLT), sistema transparente viscoso (STV) e sistema opaco (SO). Ao identificar a mudança de fase, o percentual (p/p) de cada componente foi recalculado e os respectivos sistemas preparados novamente para serem analisados por microscopia de luz polarizada, conforme descrito em 4.2.2.1. Os valores percentuais de cada componente foram utilizados para a construção do diagrama de fases ternário, utilizado o software Sigma Plot 10.



**Figura 4.1:** Esquema ilustrando o método da titulação aquosa para a construção do diagrama ternário de fases PPG-5-CETETH-20:OA:Água.

### 4.3.2 Caracterização dos sistemas contendo PPG-5-CETETH-20, oleilamina e água

#### 4.3.2.1 Microscopia de luz polarizada (MLP)

Para caracterização por MLP, uma pequena quantidade de cada uma das amostras, diluída em água ou mucina foi colocada em uma lâmina e coberta com lamínula. As amostras foram então visualizadas em um microscópio de luz polarizada Axioskop 40, equipado com câmera LEIKA. As imagens foram obtidas em um aumento de 20.000 vezes.

#### 4.3.2.2 Ensaios Reológicos

Os ensaios reológicos foram realizados utilizando viscosímetro rotacional Haake k10VT 550, rotor SV. A geometria utilizada foi de cone e placa separada por uma distância fixa de 0,2 mm. Cada amostra foi cuidadosamente aplicada à placa inferior do viscosímetro com uma espátula, assegurando o mínimo cisalhamento e permitindo um tempo

de repouso. O ensaio de fluxo foi realizado variando a velocidade de cisalhamento de 0,1 a 80 s<sup>-1</sup>. As medidas de fluxo foram tratadas mediante à aplicação do modelo da Lei das Potências:

$$\tau = \tau_0 + K.\dot{\gamma}^n$$

onde: K é um parâmetro relacionado à consistência (índice de consistência), ( $\tau$ ) é a tensão de cisalhamento, ( $\dot{\gamma}$ ) é a tensão de cisalhamento inicial e n é o índice de escoamento. Neste modelo, n > 1 representa um fluido dilatante, n < 1 representa um fluido pseudoplástico e n = 1 um fluido Newtoniano (BARNES, HUTTON, WATER, 1989). Os parâmetros de tensão de cisalhamento ( $\tau$ ) foram calculados ajustando as curvas ascendentes das curvas de fluxo ao modelo matemático, utilizando o software RheoWin Job Manager e RheoWin Data Manager.

#### 4.3.2.3 Avaliação do perfil de textura (TPA) do sistema em contato com Fluido Nasal Simulado (FNS) ou Água

A avaliação do perfil de textura (TPA, *do inglês* Texture Profile Analysis) foi realizada utilizando um analisador de textura TA-XTplus. Este teste consiste em dois ciclos de compressão da amostra que permite obter características mecânicas, como dureza, resistência à compressão, coesão e adesão. Para simular a textura dos sistemas na cavidade nasal, os sistemas foram misturados com FNS (NaCl 7,4 mg/mL, KCl 1,29 mg/mL, CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O 0,32 mg/mL e Mucina 2%, pH 5,7) ou água destilada. As amostras (8 g) foram colocadas em tubos de centrífuga de fundo cônico de 15 mL. Os tubos foram mantidos em repouso por 24 horas. Após o repouso, eles foram imersos em banho a 32 °C, e os ensaios foram realizados. No modo TPA, a prova analítica (10 mm de diâmetro) desceu sob velocidade constante de 1 mm/s, penetrou 10 mm na amostra e retornou à sua superfície com velocidade de 0,5 mm/s. Após este primeiro ciclo, a prova permaneceu em repouso por 5 s, quando então iniciou a segunda compressão. Uma curva de força *versus* tempo foi então construída utilizando o software Texture Exponent Lite, e as características mecânicas, definidas a seguir, foram obtidas:

- Dureza: corresponde ao pico de força máxima obtido durante o primeiro ciclo de compressão. É a força máxima requerida para completar uma deformação, ou seja, para a prova penetrar na amostra;

- Resistência à compressão: é o trabalho total requerido para deformar a amostra durante o primeiro ciclo de compressão da prova analítica, obtido pela área da curva do primeiro ciclo de compressão;
- Adesão: é a primeira área negativa obtida na curva força *versus* tempo e representa o trabalho necessário para contrapor as forças atrativas entre a prova analítica e a amostra estudada;
- Coesão: é a razão entre a área positiva da curva obtida durante a segunda compressão e a obtida durante a primeira compressão. Ela mede a taxa que um material se rompe sob uma ação mecânica (EXPONENT-LITE, 2009).

#### 4.3.2.4 Avaliação da força mucoadesiva

A força mucoadesiva foi avaliada por meio da medida da força necessária para destacar as amostras mantidas em contato com uma membrana modelo, utilizando o analisador de textura TAXT plus (Stable Micro Systems ®). Foram utilizados dois modelos de membrana: mucosas nasais suínas (obtidas conforme descrito em 2.3.6.1) e discos produzidos por meio da compressão direta de 250 mg de Mucina tipo II crua de estômago suíno (Sigma-Aldrich) (JONES et al., 2000). Os discos de mucina foram umedecidos com Fluido nasal simulado (FNS) e aderidos à prova analítica do equipamento enquanto que a mucosa nasal suína foi aderida à prova analítica com adesivo instantâneo cianoacrilato e suas bordas foram presas com elástico de borracha. No início do teste, as membranas aderidas à prova analítica foram imersas em FNS mantido a 32 °C e o excesso de líquido retirado com papel absorvente macio.

Para garantir o contato com a amostra, a membrana foi introduzida a 1 mm de profundidade a partir da superfície da mesma e mantida por 60 s. A prova foi então removida com velocidade constante de 0,5 mm/s, até a total separação das superfícies. A força necessária para o destacamento da membrana foi registrado usando o Software Texture Exponent Lite e um gráfico de força *versus* tempo foi construído. A partir deste gráfico, a área sob a curva (ASC) obtida durante a fase de descolamento entre a amostra e a membrana foi calculada, e reportada como trabalho de mucoadesão (TMA). O pico de mucoadesão (PMA), que é a força máxima obtida durante a retirada da prova analítica, também foi determinado. Neste estudo, o efeito da mudança de fase provocada pela diluição com muco sobre a força mucoadesiva dos sistemas foi avaliado

após diluição dos mesmo em água e FNS. Os resultados foram analisados estatisticamente pela ANOVA, seguida do teste de Tukey ( $p>0,05$ ).

## 4.4 Resultados e Discussão

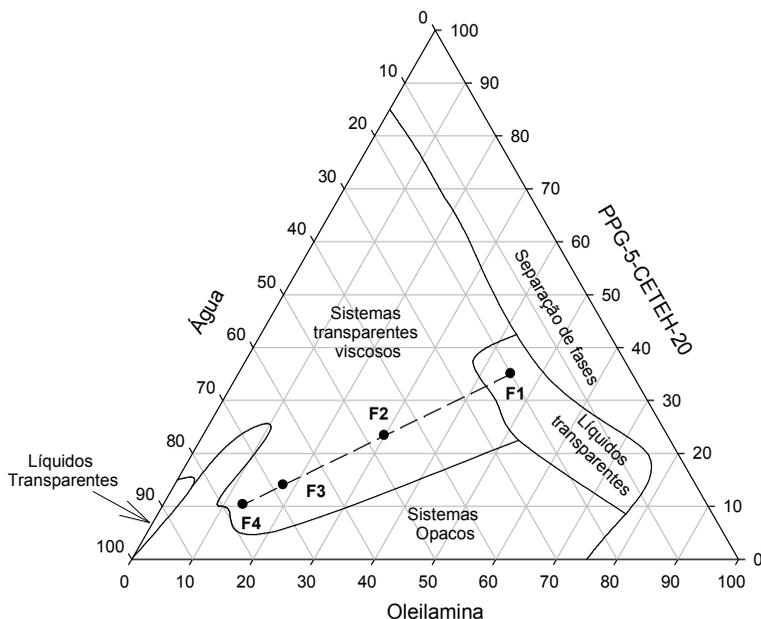
### 4.4.1 Construção do diagrama de fases ternário com a combinação de PPG-5-CETETH-20, oleilamina e água

Esta etapa do trabalho foi realizada com base em estudos anteriores conduzidos por Carvalho e colaboradores (2013), que teve como objetivo explorar a capacidade do tensoativo não iônico PPG-5-CETETH-20 em formar mesofases estruturadas, quando em contato com fluidos aquosos biológicos, permitindo a maior retenção da forma farmacêutica no local onde deve ocorrer a absorção do fármaco (ANDREWS, LAVERTY, JONES, 2009). Por meio da construção de um diagrama de fases, Carvalho e colaboradores (2013) obtiveram um SPCL a partir da mistura de PPG-5-CETETH-20, ácido oleico e água na proporção de 55:30:15 (m/m) que, quando diluído na proporção 1:1 em muco nasal artificial, tornava-se um sistema de fase lamelar anisotrópico, exibindo boas propriedades mucoadesivas. Neste trabalho, o diagrama ternário foi construído substituindo o ácido oleico pela oleilamina e encontra-se mostrado na Figura 4.2. Fotos representativas da MLP estão mostradas na Figura 4.2.

Os sistemas líquidos de baixa viscosidade e opticamente transparentes (precursores de cristais líquidos) exibem um fundo escuro sob luz polarizada. As fases cúbicas constituem um tipo de cristal líquido que também exibem um fundo escuro sob luz polarizada, mas exibem elevada viscosidade e não escoam facilmente. Sistemas semissólidos opticamente transparentes são semelhantes aos géis e exibem anisotropia sob luz polarizada, característica de cristais líquidos, sendo birrefringentes como consequência de sua organização molecular (CARVALHO et al., 2013).

Conforme mostrado no diagrama de fases, no início adição de água às misturas de PPG-5-CETETH-20 e AO, em todas as proporções analisadas, foi observado a separação de fases, mas aumentando a quantidade de água, foi possível obter SLTs (Sistemas Líquidos Transparentes). Os SLTs também foram formados no vértice esquerdo do diagrama, em uma região bem estreita, quando a diluição aquosa dos STVs (Sistemas transparentes viscosos) ultrapassou 80 % de água e quando a concentração de oleilamina ficou abaixo de 20%. Observando

o diagrama, pode-se notar que a região onde há pouco tensoativo (cerca de 20%) ocorre a formação de SO (sistema opalescente), provavelmente por conta do excesso de óleo, que faz com que a concentração de PPG-5-CETETH-20 seja insuficiente para estabilizar o sistema.



**Figura 4.2:** Diagrama de fases ternário obtido com a combinação de PPG-5-CETETH-20, oleilamina e água. No diagrama: F1<sub>(T35, O45, A20)</sub>, F2<sub>(T22, O30, A48)</sub>, F3<sub>(T14, O18, A68)</sub> e F4<sub>(T10, O12, A78)</sub>.

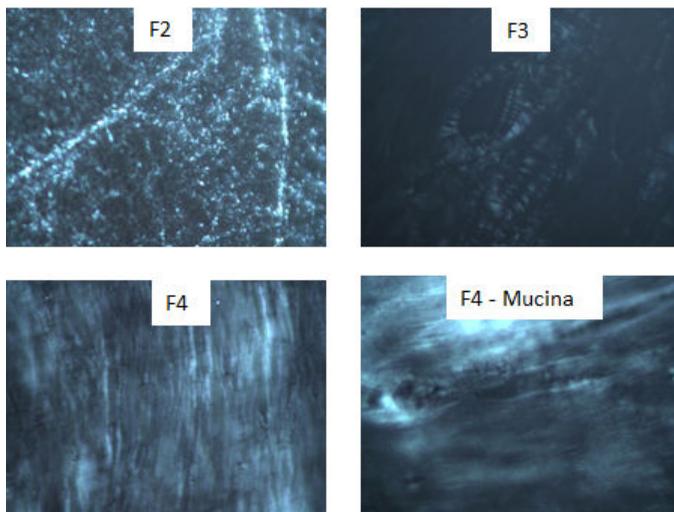
As misturas de tensoativo (PPG-5-CETETH): oleilamina (OA) e água selecionadas para a avaliação das propriedades reológicas e mucoadesivas foram aquelas designadas no diagrama ternário como F1<sub>(T35, O45, A20)</sub>, F2<sub>(T22, O30, A48)</sub>, F3<sub>(T14, O18, A68)</sub> e F4<sub>(T10, O12, A78)</sub>. As proporções e os componentes de cada formulação encontram-se descritas na Tabela 4.1.

A região de STV (sistema transparente viscoso) é formada com a mínima diluição dos SLTs com água (cerca de 5% quando F1 é usado como ponto inicial). Na região de F2<sub>(T22, O30, A48)</sub> foi possível visualizar as duas fases hexagonal e lamelar através da MLP (Figura 4.3). A fase

lamelar foi obtida apenas em F3<sub>(T14, O18, A68)</sub>, identificada pela observação das cruces de malta por MLP (Figura 4.3) e na região de F4<sub>(T10, O12, A78)</sub> a diluição com mucina pode ter alterado a organização estrutural do sistema, visto que as estrias na amostra F4 diluída com mucina não são tão visíveis como aquelas observadas após a diluição com água (Figura 4.3). Para a formulação F1<sub>(T35, O45, A20)</sub> a observação por MLP não foi possível por se tratar de um sistema isotrópico.

**Tabela 4.1:** Proporções de tensoativo (PPG-5-CETETH-20), oleilamina e água selecionadas no diagrama ternário de fases.

Amostra	Tensoativo (%, m/m)	Oleilamina (%, m/m)	Água (%, m/m)
F1 <sub>(T35, O45, A20)</sub>	35	55	20
F2 <sub>(T22, O30, A48)</sub>	22	30	58
F3 <sub>(T14, O18, A68)</sub>	12	20	68
F4 <sub>(T10, O12, A78)</sub>	10	12	78



**Figura 4.3:** Imagens obtidas por MLP das formulações  $F2_{(T22, O30, A48)}$ ,  $F3_{(T14, O18, A68)}$  e  $F4_{(T10, O12, A78)}$  onde F2 apresenta uma mistura das duas fases hexagonal e lamelar, F3 é possível identificar as cruzes de malta ou aspecto de mosaico, características da fase lamelar e F4 pode ser classificadas como fases hexagonais, pois é possível identificar as estrias características desta mesofase.

Com este estudo foi possível observar que a diluição de misturas do tensoativo PPG-5-CETETH-20 e oleilamina leva à formação de estruturas organizadas, provavelmente micelas reversas, onde as porções polares da molécula do tensoativo ficam voltadas para o meio interno aquoso, a fim de obter um estado mínimo de energia livre. Com a posterior adição de água, este sistema se mantém mais coeso a fim de garantir a estabilidade do sistema, promovendo, assim, a transição de SLT para a STV. Com a diluição aquosa do sistema a estrutura micelar do tensoativo antes esférica passa a ser mais alongada, com organização hexagonal, se mantendo assim até aproximadamente 75% de água. Quando a quantidade de água excede a capacidade do tensoativo de estabilizar o sistema, a primeira passa a ser o meio externo e o tensoativo se reorganiza de modo que sua porção hidrofílica se expõe para o ambiente aquoso, formando micelas normais.

O diagrama de fases é uma ótima ferramenta para entender os diversos tipos de sistemas formados a partir de três componentes ou mais. Esta ferramenta possibilita o planejamento e a utilização das proporções corretas de cada componente dependendo do tipo de aplicação, via de administração ou forma farmacêutica necessária. Por exemplo, para a utilização de sistemas constituídos de PPG-5-CETETH:OA:água para liberação tópica de substâncias ativas, a formulação  $F2_{(T22, O30, A48)}$  seria mais adequada, visto que apresenta certa viscosidade e boas características mucoadesivas, além de permitir a fácil aplicação. Para a administração pela via oral, nasal e ocular, por outro lado, é necessário que a preparação apresente baixa viscosidade e boas propriedades mucoadesivas, de modo a aumentar o tempo de contato da forma farmacêutica com as mucosas. Neste caso, o sistema  $F1_{(T35, O45, A20)}$  seria mais adequado.

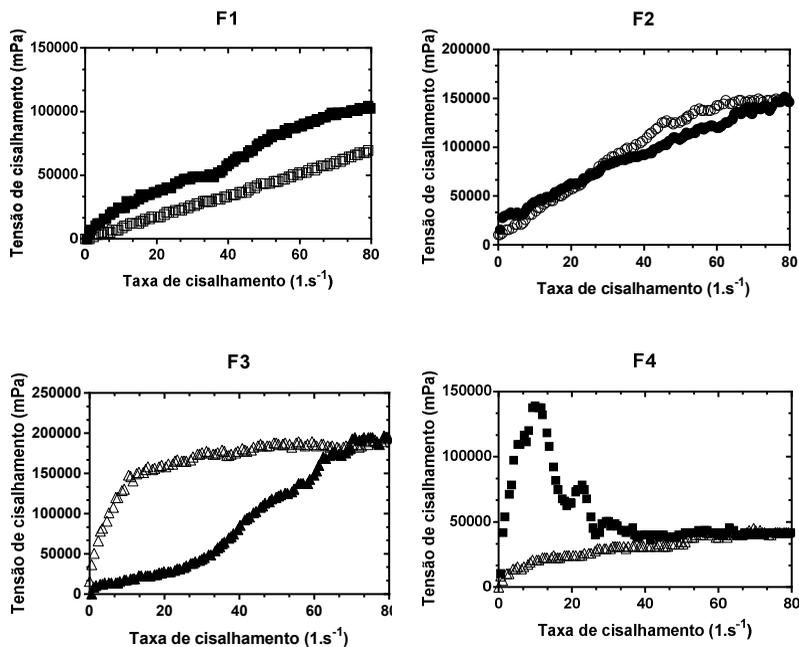
Sistemas líquidos transparentes, como indicado em F1, são estáveis e podem ser utilizados como precursores de cristais líquidos para aplicação nasal, visto que podem ser facilmente instilados, e, com diluição de apenas 5% com fluido nasal, apresentaria uma estrutura hexagonal, viscosa e mucoadesiva. Além disso, sistemas precursores de cristais líquidos, além de serem bons veículos para a administração de fármacos, são de fácil preparação, pois não necessitam de equipamentos onerosos e nem da utilização de solventes orgânicos, empregados na maioria das técnicas para obtenção de sistemas estabilizados por tensoativos. Outro ponto relevante é a estabilidade termodinâmica dos sistemas formados, devido à sua organização estrutural. Estes fatores poderiam contribuir para escalonamento da produção destes sistemas, que é um grande desafio apresentado à indústria farmacêutica para tornar realidade a sua utilização como novos medicamentos.

#### 4.4.2 Análise reológica dos sistemas PPG-5-CETEH-20/AO/água

As formulações desenvolvidas foram caracterizadas quanto às propriedades reológicas para caracterizar seu escoamento, propriedade que possibilita a aplicação nasal. As curvas de fluxo obtidos estão representados na Figura 4.4. A forma da curva do reograma das formulações  $F1_{(T35, O45, A20)}$ ,  $F2_{(T22, O30, A48)}$ ,  $F3_{(T14, O18, A68)}$ ,  $F4_{(T10, O12, A78)}$

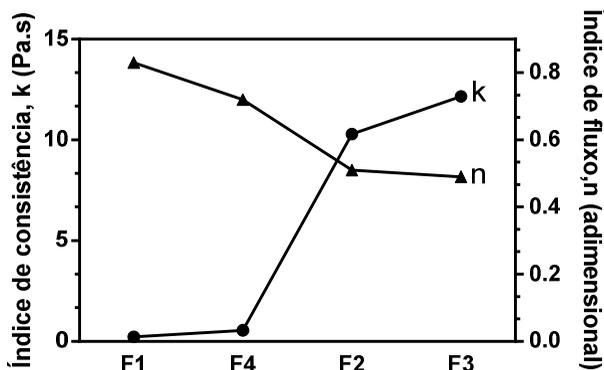
sendo característica de um fluxo não Newtoniano, pois viscosidade é alterada com o aumento da taxa de cisalhamento. Além disso, as amostras apresentaram comportamento tixotrópico, ou seja, o sistema recupera sua estrutura inicial com a diminuição da taxa de cisalhamento (LEE, MOTURIA, LEE, 2009). O efeito da diminuição da viscosidade com o aumento da taxa de cisalhamento, como ocorreu em todas as formulações avaliadas, as caracteriza como apresentando um comportamento pseudoplástico (BARNES, HUTTON, WATER, 1989; ANSEL, POPOVICH, ALLEN, 2000). Este comportamento reológico é desejável em processos em que a viscosidade em fluxo deve ser menor que a viscosidade em repouso, possibilitando que produtos farmacêuticos escoem com certa facilidade das embalagens e sejam aplicados por seringas ou frascos aplicadores, além de permitir o espalhamento da formulação no local da aplicação.

Todas apresentam comportamento pseudoplástico, mas a viscosidade inicial não é a mesma.



**Figura 4.4:** Curvas de fluxo obtidas para as formulações F1<sub>(T35, O45, A20)</sub>, F2<sub>(T22, O30, A48)</sub>, F3<sub>(T14, O18, A68)</sub>, F4<sub>(T10, O12, A78)</sub> a 25°C. Os símbolos fechados representam as curvas de fluxo ascendentes, e os símbolos abertos representam as curvas de fluxo descendentes.

A Figura 4.5 e Tabela 4.2 mostram os valores de índice de consistência ( $k$ ) e índice de fluxo ( $n$ ) obtidos após ajuste das curvas de fluxo ao modelo matemático da Lei das Potências. Os valores de “ $n$ ” foram menores que 1 para todas as formulações, comprovando o comportamento pseudoplástico das formulações. Entretanto, os valores de “ $k$ ” foram elevados para as formulações F2<sub>(T22, O30, A48)</sub> e F3<sub>(T14, O18, A68)</sub>, e podem ser atribuídos às estruturas lamelar e hexagonal presentes nestas duas formulações.



**Figura 4.5:** Valores de índice de consistência (k) e índice de fluxo (n) calculados a partir da aplicação da lei das potências nas curvas de fluxo obtidas para as diferentes formulações.

**Tabela 4.2:** Parâmetros de fluxo obtidos após aplicação da lei das potências nas curvas de fluxo obtidas a partir das formulações.

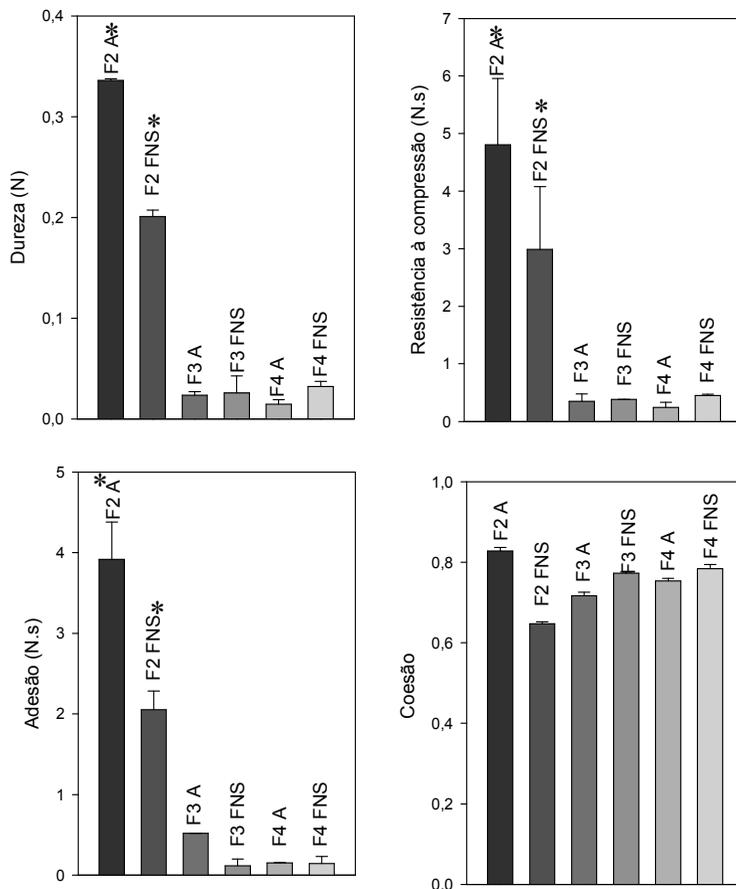
Formulação	K (Pa.s)	n	$r^2_{pot}$
<b>F1</b> (T35, O45, A20)	<b>0,22</b>	<b>0,83</b>	<b>0,90</b>
<b>F2</b> (T22, O30, A48)	<b>10,28</b>	<b>0,51</b>	<b>0,99</b>
<b>F3</b> (T14, O18, A68)	<b>12,15</b>	<b>0,49</b>	<b>0,97</b>
<b>F4</b> (T10, O12, A78)	<b>0,55</b>	<b>0,72</b>	<b>0,83</b>

Na tabela, k: índice de consistência; n: índice de fluxo;  $r^2$ : coeficiente de correlação.

#### 4.4.3 Avaliação do perfil de textura (TPA) dos sistemas em contato com FNS e água

Esta caracterização foi realizada para as formulações misturadas com o FNS e água, a fim de investigar as mudanças que podem ocorrer na textura dos sistemas quando entram em contato com o muco da cavidade nasal. A preparação das amostras foi realizada usando F1<sub>(T35, O45, A20)</sub> como ponto inicial. No teste TPA é necessário que a amostra imponha resistência à entrada da prova analítica, denominada como força de gatilho (trigger force), cujo valor estipulado foi de 2 mN. Os

valores médios obtidos para os parâmetros dureza, resistência à compressão, adesão e coesão estão demonstrados na Figura 4.6.



**Figura 4.6:** Parâmetros de dureza, resistência à compressão, adesão e coesão das amostras, após a diluição de F1 com água (A) e fluido nasal simulado (FNS). \*Indica diferença estatística entre as médias ( $p > 0,05$ ).

Quanto à dureza, resistência à compressão e adesão, a amostra que apresentou maior valor foi a F2<sub>(T22, O30, A48)</sub>, diluída com água e FNS. Os valores obtidos foram estatisticamente diferentes daqueles obtidos

nas demais diluições ( $p < 0,05$ ). Esta diferença pode ser atribuída a maior viscosidade deste sistema com relação aos demais. A maior viscosidade pode ser resultante da presença de uma mistura complexa de fases lamelar e hexagonal. Portanto, pode ser sugerido que quanto maior a organização da mesofase líquido-cristalina, maior será sua adesão. A dureza e a resistência à compressão são parâmetros que podem ser relacionados à rigidez da amostra. Quanto maior o valor de dureza e adesão, maior é a força de cisalhamento e ação da depuração mucociliar necessárias para remover o sistema, portanto, esta característica pode ser indicativo de mucoadesão.

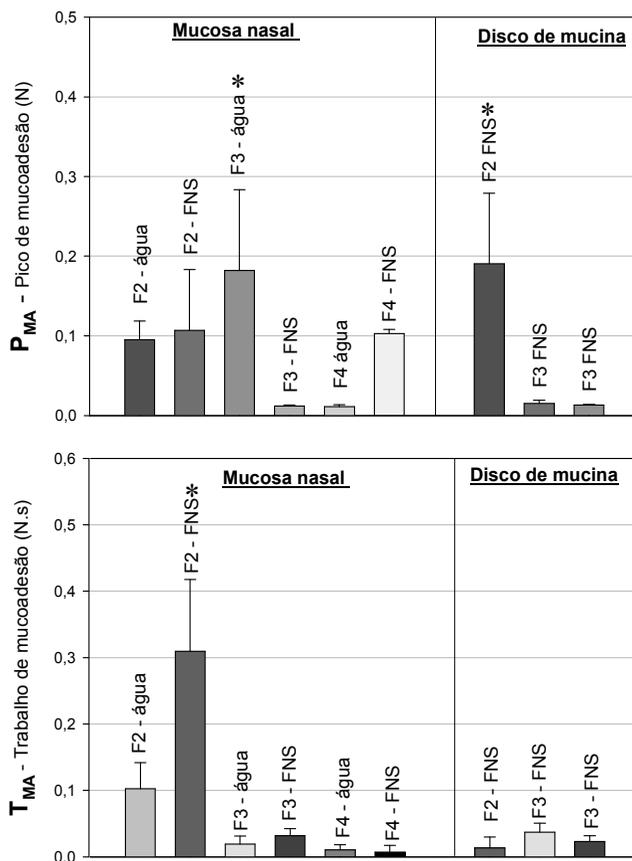
Os valores de coesão obtidos para os cristais líquidos foram em média de 0,8, o que significa que houve cerca de 20 % de deformação das amostras, sob a ação mecânica do equipamento utilizado no teste, ou seja, a baixa velocidade utilizada não foi suficiente para deformar a mesofase líquido-cristalina. Esta característica pode ser uma vantagem para sistemas mucoadesivos de liberação nasal, os quais permitem aumentar o tempo de residência da forma farmacêutica na cavidade nasal, aumentando a absorção do constituinte ativo. Valores menores que 20% de deformação dos sistemas poderiam resultar na inibição do mecanismo fisiológico de depuração mucociliar, causando danos na mucosa o que, com certeza, não é desejável. Assim, a coesão é um parâmetro importante para caracterizar a desintegração da amostra que pode ser correlacionada com os efeitos provocados pela depuração mucociliar das mucosas.

#### 4.4.4 Avaliação da força mucoadesiva

Os parâmetros estudados neste teste foram o pico de mucoadesão ( $P_{MA}$ ) e trabalho de mucoadesão ( $T_{MA}$ ). A preparação das amostras foi realizada a partir da formulação F1<sub>(T35, O55, A20)</sub>, a qual foi diluída com FNS ou água para preparação das demais. Os resultados obtidos para os sistemas F2<sub>(T22, O30, A48)</sub>, F3<sub>(T14, O18, A68)</sub> e F4<sub>(T10, O12, A78)</sub>, diluídos com FNS ou água, nos dois modelos de membranas utilizados, estão apresentados na Figura 4.7. As amostras diluídas em FNS exibiram maiores valores de trabalho de mucoadesão que aquelas diluídas apenas em água, talvez pela interação eletrostática entre o lipídeo catiônico (OA) e a mucina. Entretanto, significância estatística foi encontrada somente para o valor de trabalho de mucoadesão ( $T_{MA}$ )

na amostra  $F2_{(T22, O30, A48)}$  diluída com FNS ( $p > 0,05$ ). Quando o disco de mucina foi empregado, diferenças estatísticas foram verificadas apenas no valor de  $P_{MA}$ , quando a amostra  $F2_{(T22, O30, A48)}$ , diluída com FNS, foi comparada com as demais. Esta diferença pode ser atribuída a maior viscosidade deste sistema com relação às demais formulações, o qual é resultante da presença de uma mistura complexa de fases lamelar e hexagonal. Quando a mucosa nasal foi utilizada nos ensaios, o pico de mucoadesão diferiu estatisticamente apenas quando  $F3_{(T14, O18, A68)}$  foi comparado com as demais amostras. Embora o pico de mucoadesão tenha sido maior nas amostras F3 e F2, os valores não foram suficientes para afetar o trabalho de mucoadesão.

Tendo em vista os resultados obtidos, é perceptível que o tipo de modelo de membrana afetou os valores de  $P_{MA}$  e  $T_{MA}$ . Estas diferenças de resultados encontrados entre os modelos de membrana podem ser explicadas pela diferença na composição entre elas. O disco de mucina é composto totalmente por mucina compactada e não hidratada. Como as amostras avaliadas continham apenas uma pequena quantidade de água e, visto que a água contida na formulação não foi suficiente para penetrar nos poros do disco de mucina, esta membrana não proporcionou mucoadesão. Já a mucosa suína apresenta inúmeros constituintes, além de água, e não é porosa, como o disco de mucina. Neste caso, a mucoadesão ocorreu pela absorção de líquido pela amostra, sendo intensificada por meio da formação de interações fracas entre os constituintes da amostra e aqueles presentes na mucosa (SMART, 2005).



**Figura 4.7:** Valores de pico de mucoadesão ( $P_{MA}$ ) e trabalho de mucoadesão ( $T_{MA}$ ) obtidas para as amostras diluídas em água e fluido nasal simulado (FNS), utilizando mucosa nasal suína e disco de mucina como modelos de membrana ( $n=3$ ). \*indica diferença estatística determinada pela análise da variância, seguida do teste de Tukey ( $p>0,05$ ).

Carvalho e colaboradores (2010) desenvolveram uma formulação de baixa viscosidade constituída de PPG-5-CETETH-20, ácido oleico e água (55:30:15, m/m) que é um sistema precursor de CL,

pois quando diluída na proporção 1:1 em fluido nasal simulado, torna-se um sistema de fase lamelar. Este sistema lamelar foi avaliado da mesma forma e a força mucoadesiva obtida pelos autores foi de 0,306 – 0,283 N, valores estes muito próximos dos obtidos neste trabalho. A alteração do ácido oleico pela OA, deste trabalho, possibilitou a redução do tensoativo e o aumento na concentração do óleo no sistema precursor de CL (amostra F1<sub>(T35, O45, A20)</sub>) esta característica é muito interessante pelo fato de alguns tensoativos serem irritantes às mucosas e esta irritação tende a aumentar proporcionalmente à concentração (EKELUND et al., 2005; CSÁKI, 2011).

A F1<sub>(T35, O45, A20)</sub> teria maior potencial em atuar como um sistema precursor de CL, por apresentar menor viscosidade possibilitando o escoamento com certa facilidade o que viabiliza a aplicação nasal além de permitir o espalhamento da formulação no local da aplicação. Além disso, ao diluir esta amostra 1:2 formaria a amostra F2<sub>(T22, O30, A48)</sub> com maior viscosidade, provavelmente, resultante da presença de uma mistura complexa de fases lamelar e hexagonal e com indicativo de mucoadesão pelo teste do TPA. E ainda, diluindo a amostra F1, na proporção de cerca de 1:4 se obtém a amostra F3<sub>(T14, O18, A68)</sub>, que apresenta características de CL com mesofases lamelar e ainda com certa mucoadesão decorrente do mesmo teste.

---

---

CONCLUSÕES PARCIAIS

---

---

- O diagrama de fase ternário obtido pela titulação aquosa nas formulações contendo o tensoativo (PPG-5-CETETH-20) e o lipídeo catiônico (oleilamina) e água proporcionou o desenvolvimento de um sistema precursor de cristal líquido mucoadesivo de fase lamelar e hexagonal de fácil execução e baixo custo.
- O estudo de reologia das formulações é característica de um fluxo não Newtoniano com comportamento tixotrópico definido por um fluxo pseudoplástico, ou seja, a viscosidade diminui quando submetidos ao atrito. Esta característica interessante do ponto de vista tecnológico, facilita a aplicação e ainda permite o espalhamento da formulação F1 (sistema precursor de cristal líquido) no local da aplicação.
- Quanto à dureza, resistência à compressão e adesão, a amostra que apresentou maior valor foi a  $F2_{(T22, O30, A48)}$  diluída com água e FNS. Os valores obtidos foram estatisticamente diferentes das demais diluições ( $p < 0,05$ ) para todos estes parâmetros, esta diferença pode ser atribuída a maior viscosidade deste sistema com relação às demais formulações. Os valores de coesão para todas as amostras foram em média de 0,8, o que significa que houve cerca de 20 % de deformação das amostras sob a ação mecânica do equipamento utilizado no teste TPA o que dificulta a depuração mucociliar. Estes dois parâmetros indicam que maior é a força de cisalhamento e a ação da depuração mucociliar para remover o sistema, o que pode ser indicativo de mucoadesão.
- Com relação à força mucoadesiva as amostras diluídas em FNS exibiram maiores valores de trabalho de mucoadesão em comparação com aquelas diluídas apenas em água talvez pela interação eletrostática entre o lipídeo catiônico (OA) e a mucina. Entretanto, significância estatística foi encontrada somente para o valor de trabalho de mucoadesão ( $T_{MA}$ ) na amostra  $F2_{(T22, O30, A48)}$  diluída com FNS ( $P > 0,05$ ).
- As amostras diluídas em FNS exibiram maiores valores de trabalho de mucoadesão que aquelas diluídas apenas em água talvez pela interação eletrostática entre o lipídeo catiônico (OA) e a mucina. Entretanto, significância estatística foi encontrada somente para o valor de trabalho de mucoadesão ( $T_{MA}$ ) na amostra  $F2_{(T22, O30, A48)}$  diluída com FNS ( $p > 0,05$ ) nos dois modelos de membrana. A diferença estatística pode ser

atribuída a maior viscosidade deste sistema com relação às demais formulações, resultante da presença de uma mistura complexa de fase lamelar e hexagonal. Com relação ao pico de mucoadesão a amostra F3<sub>(T14, O18, A68)</sub> utilizando a mucosa nasal foi a única amostra que obteve diferença significativa com a mucosa e a da mesma forma a F2<sub>(T22, O30, A48)</sub> utilizando o disco de mucina.

---

---

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

---

---

Doenças neurodegenerativas como a Doença de Alzheimer representam um crescente problema em nossa sociedade, em que a expectativa de vida é cada vez maior. A doença de Alzheimer é caracterizada pelo declínio progressivo no número de neurônios colinérgicos causado pelo acúmulo de depósitos de proteínas amilóides insolúveis. (GALLAGHER e COLOMBO, 1995, SISODIA & PRICE, 1995; SELKOE, 1999). Na doença de Alzheimer, o número de placas senis está correlacionado ao grau do dano neuronal e aos prejuízos cognitivos, sendo a causa mais comum de demência no idoso (SELKOA, 1994). É uma doença altamente incapacitante com apresentação clínica e patológica bem definidas, afetando pelo menos 5% dos indivíduos com mais de 65 anos e 20% daqueles com mais de 80 anos. Assim, estudos para o tratamento da Doença de Alzheimer têm despertado grande interesse no sentido de reverter ou estagnar o avanço da doença.

Compostos polifenólicos naturais e seus análogos constituem um grupo heterogêneo de metabólitos secundários vegetais conhecidos por apresentar várias atividades biológicas. Estes compostos são classificados quimicamente em ácido fenólicos e análogos, estilbenos, flavonóides e um quarto grupo que inclui as cumarinas, lignanos e taninos. Tais compostos têm sido associados à redução dos riscos associados a inúmeras doenças crônicas, incluindo câncer, doenças cardiovasculares, inflamações crônicas e doenças neurodegenerativas, as quais têm sido relacionadas ao estresse oxidativo proveniente do excesso de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio no organismo. Compostos polifenólicos são potentes agentes antioxidantes e suprimem a geração de radicais livres, reduzindo a taxa de oxidação pela inibição da formação ou desativação de espécies reativas e precursores de radicais livres. Esta propriedade dos polifenóis é decorrente da estrutura química desses compostos, a qual é constituída por pelo menos um anel aromático contendo um grupamento hidroxila (FRESCO et al., 2006).

Dentre os compostos fenólicos largamente distribuídos na natureza destacam-se os ácidos fenólicos, que se caracterizam-se por apresentar um anel benzênico, um grupamento carboxílico e um ou mais grupamentos de hidroxila e/ou metoxila na molécula. O ácido elágico, um derivado dimérico do ácido gálico, é um composto fenólico encontrado em frutas como o morango, romã, framboesa, amora, dentre outras que tem mostrado exibir inúmeras atividades farmacológicas

(PRIYADARSINI et al., 2002). O potencial terapêutico deste composto no tratamento da Doença de Alzheimer foi mostrado em estudos prévios, tanto *in vitro* como *in vivo*. Entretanto, um fator importante que influencia a efetividade da interação dos polifenóis encontrados na dieta com os parâmetros celulares é a sua baixa biodisponibilidade pela via oral. O ácido elágico, como todos compostos polifenólicos, é extensivamente metabolizado pela microflora colônica, durante sua passagem pelo intestino, e pelo fígado, resultando na alteração significativa das espécies encontradas na circulação sistêmica (SOOBRAATTEE et al., 2005). Além disso, o ácido elágico se acumula no epitélio do trato gastrointestinal devido a sua extensa ligação com as proteínas e ADN e, mesmo que uma fração alcance a circulação sistêmica, tal composto demonstrou ser semi-impermeável à barreira hematoencefálica, o que limita, assim, o seu alcance no SNC, quando a via oral é empregada.

Assim, visando aumentar a concentração do AE no sistema nervoso central, a via nasal foi explorada neste trabalho, por apresentar a particularidade de prover um acesso direto ao parênquima cerebral por meio da região olfatória. Por outro lado, esta via apresenta limitações para a administração de medicamentos, tal como o pequeno volume que pode ser instilado e o curto tempo de residência da forma farmacêutica no sítio de administração, em decorrência de um importante mecanismo de proteção do organismo, a depuração mucociliar. Assim, o uso de nanoemulsões catiônicas com veículo para a administração nasal do AE foi proposta. Nanoemulsões apresentam a capacidade de veicular fármacos lipofílicos (como o AE) em dispersões aquosas e, devido a sua elevada área superficial decorrente do seu tamanho reduzido, proporcionam uma elevada área de contato com a mucosa nasal, favorecendo a absorção. A carga positiva dessas preparações proporcionaria uma maior interação com a mucina, uma glicoproteína constituinte do muco, que é carregada negativamente no pH da cavidade nasal, devido à presença de resíduos ácido siálico da porção sacarídica da sua estrutura. Este tipo de interação aumentaria o tempo de permanência da preparação na cavidade nasal, o que também contribuiria para a maior biodisponibilidade do AE após administração nasal.

Assim, na procura de comprovar as hipóteses levantadas neste trabalho, nanoemulsões catiônicas contendo ácido elágico foram desenvolvidas, e os resultados foram exibidos no segundo capítulo deste

manuscrito. As nanoemulsões foram obtidas com o uso de TCM como fase oleosa, lecitina, e oleilamina ou estearilamina como lipídeo catiônico. Por meio de um estudo de formulação onde se variou a concentração de óleo e a o tipo e concentração de lipídeo catiônico, foram obtidas nanoemulsões monodispersas e a apresentando gotículas com carga superficial positiva. As melhores formulações foram aquelas constituídas com 4% ou 8% de TCM e com as concentrações de 0,01 mM e 0,05 mM de lipídeo catiônico. Para determinação do ácido elágico, um método de espectrofluorimetria foi desenvolvido e validado. As análises mostraram que o teor de AE nas nanoemulsões variou em função, principalmente, da concentração de lipídeo catiônico na formulação. A partir destes resultados, juntamente com os resultados de potencial zeta e espectroscopia de absorção no infravermelho, foi sugerido que o AE interage com o lipídeo catiônico, sendo parcialmente localizado na superfície das gotículas da nanoemulsão. Os elevados valores de EE (cerca de 95%) obtidos indicaram que o AE encontra-se preferencialmente associado às gotículas. Ainda, estudos *in vitro* mostraram que os procedimentos empregados na preparação das nanoemulsões não afetaram a atividade antioxidante do ácido elágico.

Por outro lado, não foram observados efeitos significativos nas características das nanoemulsões preparadas com OA ou EA, no entanto, pela maior facilidade de manipulação, as nanoemulsões preparadas com OA foram selecionadas para os ensaios subsequentes. A incubação das nanoemulsões preparadas com OA com uma dispersão de mucina indicou a existência de interações, que pareceu ser dependente da concentração de lipídeo catiônico na formulação. Finalmente, estudos de permeação do AE através da mucosa nasal mostraram que, independente da presença do lipídeo catiônico, as nanoemulsões conduziram à maior permeação do AE, quando comparado os resultados obtidos após aplicação de uma solução deste ácido fenólico. Este resultado foi associado ao elevado grau de dispersibilidade dessas preparações, que permite uma melhor distribuição e contato do AE na mucosa. Entretanto, este resultado não reflete necessariamente resultados que seriam observados *in vivo*, uma vez que a interação do lipídeo catiônico com a mucina poderia contribuir ainda mais com o aumento da absorção nasal deste composto.

Na continuidade do trabalho, foi avaliado a atividade do AE livre e nanoemulsionado em modelos experimentais *in vivo* da doença de Alzheimer, após a infusão i.c.v do peptídeo A $\beta$ <sub>1-40</sub> em camundongos.

Este procedimento induz uma série de alterações (como prejuízos olfatórios, cognitivos e motores, ativação de células da glia e reações inflamatórias, perda sináptica e estresse oxidativo) em roedores, muito semelhantes às observadas nesta patologia. O ácido elágico livre e nanoemulsionado foi administrado pela via oral e nasal, e os resultados foram comparados. A infusão intracerebroventricular do peptídeo A $\beta$ <sub>1-40</sub> causou déficit cognitivo nos animais conforme demonstrado no teste comportamental de realocação de objeto. Quando administrado pela via oral, a administração do ácido elágico livre na dose de 20 mg/kg não foi capaz de produzir uma melhora significativa na função cognitiva. Entretanto, esta melhora foi observada após administração do ácido elágico livre na dose de 50 mg/kg, e da nanoemulsão (NE<sub>OA</sub> (4%, 0,05mM)), na dose de 3,37 mg/kg. Pela via nasal, a administração da nanoemulsão (NE<sub>OA</sub> (4%, 0,05mM)) na dose de 64  $\mu$ g/kg, produziu uma melhora na função cognitiva de maneira significativa. Estes resultados mostram por um lado, que a administração oral das nanoemulsões aumentam a absorção do ácido elágico por esta via. Inúmeros estudos têm mostrado que o aumento da biodisponibilidade de compostos lipofílicos a partir de formulações lipídicas, como as nanoemulsões, está associado aos processos de digestão de lipídios que ocorre por esta via. A digestão dos lipídios gera outros tipos de estruturas coloidais como micelas, micelas mistas, vesículas que possuem a vantagem de apresentar os fármacos em uma forma dissolvida, com uma elevada superfície de contato para absorção. Além disso, o tamanho reduzido das gotículas oferece elevada área superficial para a hidrólise dos lipídios pela lipase pancreática, além de proporcionar o aumento da velocidade de liberação de fármacos (CHAKRABORTY et al., 2009). Por outro lado, a dose do AE por via nasal que produziu melhora significativa na função cognitiva foi muito mais baixa que aquelas administradas pela via oral, tanto para o AE na forma livre como nanoemulsionado. Este resultado evidencia os benefícios da administração nasal de fármacos que devem agir no SNC. Além de evitar o metabolismo intestinal, fármacos administrados por esta via contornam a barreira hematoencefálica, permitindo que concentrações efetivas alcancem o cérebro. Ainda, em ambas vias de administração, o efeito mucoadesivo das nanoemulsões catiônicas também deve ter contribuído para a obtenção dos resultados verificados nos estudos *in vivo*. Apesar destes resultados, não foram observadas alterações nos marcadores bioquímicos de estresse oxidativo, após a administração i.c.v, do peptídeo beta amiloide. Isto parece estar

relacionado a fatores inerentes ao modelo farmacológico usado que podem afetar os resultados. Estes fatores interferentes incluiriam o local de administração e o tipo de peptídeo infundido, o procedimento de infusão, e o tempo entre a infusão e a realização dos estudos, entre outros.

Por fim, no quarto e último capítulo desta tese foi proposto uma nova formulação para veiculação de ácido elágico por via nasal. Esta formulação é constituída por um sistema precursor de cristal líquido (SPCL), com propriedades mucoadesivas, o qual é composto por uma mistura de PPG-5-CETETH-20, oleilamina e água. Estes resultados foram baseados um trabalho realizado por Carvalho et al. (2013), em que os autores mostraram a vantagem da utilização destes sistemas para a administração nasal da zidovudina. Assim, para verificação das proporções de PPG-5-CETETH-20, oleilamina e água que formam SPCL, um diagrama ternário foi construído e a partir das observações dos sistemas formados, misturas dos três componentes foram caracterizadas por microscopia de luz polarizada e quantos às propriedades reológicas, propriedades de dureza, adesão e coesão, e propriedades mucoadesivas. Uma formulação contendo PPG-5-CETETH-20, oleilamina e água na proporção de 35:55:20 foi selecionada com SPCL, sendo caracterizada por apresentar baixa viscosidade e, portanto, podendo ser facilmente instilada para administração nasal. A diluição deste sistema com água leva à formação de sistemas transparentes viscosos e mucodesivos, que poderiam permanecer retidos na mucosa nasal, favorecendo a absorção do fármaco. A incorporação de AE foi realizada nesta mistura de PPG-5-CETETH-20, oleilamina e água. Entretanto, os resultados observados na tentativa de quantificar o AE por CLAE e também ensaios de atividade antioxidante nas formulações (o AE não exibiu atividade antioxidante), indicaram que o AE apresenta baixa estabilidade neste sistema ou que interações entre os componentes da formulação possam ter ocorrido. Estes resultados não foram mostrados nesta tese, visto que não foram conclusivos e outros estudos precisariam ser realizados para elucidar os fenômenos observados. Entretanto, tal sistema oferece uma nova possibilidade para a administração nasal de fármacos que, além das vantagens já citadas, são de fácil preparação, não usam solventes orgânicos nas formulações e, portanto, sua obtenção é facilmente escalonável para produção industrial.

---

---

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

---

---

ABREU, I. D.; FORLENZA, O. V.; BARROS, H. L. Demência de Alzheimer: correlação entre memória e autonomia. *Revista de Psiquiatria Clínica*, v. 32, n. 3, 2005.

ACHARYA, J.; PUNCHARD, N. A.; TAYLOR, J. A.; THOMPSON, R. P. H.; PEARSON, J. T. C. Red cell lipid peroxidation and antioxidant enzymes in iron deficiency. **European Journal of Haematology**, v. 47, p. 287-291, 1991.

AEBI, H.; WYSS, S. R.; SCHERZ, B.; SKVARIL, F. Heterogeneity of erythrocyte catalase II. Isolation and characterization of normal and variant erythrocyte catalase and their subunits. **European Journal of Biochemistry**, v. 48, p. 137-145, 1974.

AHMED, K.; LI, Y.; MCCLEMENTS, D. J.; XIAO, H. Nanoemulsion- and emulsion-based delivery systems for curcumin: Encapsulation and release properties. **Food Chemistry**, v. 132, n. 2, p. 799-807, 2012.

ALAM, M. I.; BEG, S.; SAMAD, A.; BABOOTA, S.; KOHLI, K.; ALI, J.; AHUJA, A.; AKBAR, M. Strategy for effective brain drug delivery. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 40, p. 385-403, 2010.

ALMEIDA, M.; TEIXEIRA, H. F.; KOESTER, L. Preparação de Emulsões Submicrométricas: Aspectos Teóricos sobre os Métodos Empregados na Atualidade. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 27, n. 5, p. 780-788, 2008.

Alzheimer's Association. 2013. Disponível em: < [www.alz.org](http://www.alz.org) >.

AMIDON, G. L.; LENNERNAS, H.; SHAH, V. P.; CRISON, J. R. A. A theoretical basis for a biopharmaceutical drug classification: the correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability. **Pharm. Res.**, p. 413-420, 1995.

ANDREWS, G. P.; LAVERTY, T. P.; JONES, D. S. Mucoadhesive polymeric platforms for controlled drug delivery. **European**

**Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 71, n. 3, p. 505-518, 2009.

ANSEL, H. C.; POPOVICH, N. G.; ALLEN, L. V. **Formas farmacêuticas e sistemas de liberação de fármacos**. São Paulo: Editorial Premier, 2000.

ARORA, P.; SHARMA, S.; GARG, S. Permeability issues in nasal drug delivery. **Drug Discovery Today**, v. 7, n. 18, p. 967-975, 2002.

ASSINI, F. L.; DUZZIONI, M.; TAKAHASHI, R. N. Object location memory in mice: Pharmacological validation and further evidence of hippocampal CA1 participation. **Behavioural Brain Research**, v. 204, n. 1, p. 206-211, 2009.

AULTON, M. E. **Delineamento de formas farmacêuticas**. 2. Porto Alegre: 2005.

BALA, I.; BHARDWAJ, V.; HARIHARAN, S.; KUMAR, M. N. V. R. Analytical methods for assay of ellagic acid and its solubility studies. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 40, n. 1, p. 206-210, 2006. ISSN 0731-7085.

BALAZS, L.; LEON, M. Evidence of an oxidative challenge in the Alzheimer's brain. **Neurochemical Research**, v. 19, p. 1131-1137, 1994.

BANDOPADHYAY, U.; DIPAK, D.; BANERJEE, R. K. Reactive oxygen species: oxidative damage and pathogenesis. **Curr. Sci.**, v. 77, p. 658-666, 1999.

BARAK, Y.; AIZENBERG, D. Is dementia preventable? Focus on Alzheimer's disease. **Expert Rev Neurother.**, v. 10, n. 11, p. 1689 - 1698, 2010.

BARNES, H. A.; HUTTON, J. F.; WATER, K. **An introduction to rheology**. Amsterdam: Elsevier 1989.

BERRA, C. M.; MENCK, C. F. M.; DI MASCIO, P. Estresse oxidativo, lesões no genoma e processos de sinalização no controle do ciclo celular. **Química Nova**, v. 29, p. 1340-1344, 2006.

BERTRAM, L.; TANZI, R. Thirty years of Alzheimer's disease genetics: the implications of systematic meta-analyses. **Nature Reviews**, v. 9, p. 768 - 778, 2008.

BEUTLER, E.; DURON, O.; KELLY, B. M. Improved method for the determination of blood glutathione. **The Journal of Laboratory Clinical Medicine**, v. 61, p. 882 - 888, 1963.

BHARGAVA, H. N. N., A.; LIEB, L.M. Using microemulsions for drug delivery. **Pharmaceutical Technology**, v. 3, p. 46 - 54, 1987.

BHATT, P.; MADHAV, S. A detailed review on nanoemulsion drug delivery system. **International Journal of Pharmaceutics Science and Research**, v. 2, n. 10, p. 2482-2489, 2011.

BIRBEN, E.; SAHINER, U. M.; KALAYCI, O. Oxidative Stress and Antioxidant Defense. **The World Allergy Organization journal**, v. 5, p. 1-19, 2012.

BLOIS, S. A note on free radical formation in biologically occurring quinones. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 18, n. 0, p. 165, 1955.

BOECK, C. R.; GANZELLA, M.; LOTTERMANN, A.; VENDITE, D. NMDA Preconditioning Protects against Seizures and Hippocampal Neurotoxicity Induced by Quinolinic Acid in Mice. **Epilepsia**, v. 45, p. 745 - 750, 2004.

BOUCHEMAL, K.; BRIANÇON, S.; PERRIER, E.; FESSI, H. Nano-emulsion formulation using spontaneous emulsification: solvent, oil and surfactant optimisation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 280, n. 1-2, p. 241-251, 2004.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC 27, de 29 de maio de 2003. Determina a publicação do "Métodos bioanalíticos empregados em estudos com fins de registro e pós-registro de medicamentos.. Publicado no D.O.U. - 22 de maio de **Diário Oficial da União**, 2012.

BROWN, J. Mutations in amyloid precursor protein gene and Alzheimer's disease. **Lancet**, p. 923–924, 1991.

BRUNTON, L. L.; LAZO, J. S.; PARKER, K. L. **Goodman & Gilman: Manual de Farmacologia e Terapêutica**. 11ª Edição. Rio de Janeiro: McGrawHill, 2007.

BUTTERFIELD, D. A.; DRAKE, J.; POCERNICH, C.; CASTEGNA, A. Evidence of oxidative damage in Alzheimer's disease brain: central role for amyloid  $\beta$ -peptide. **TRENDS in Molecular Medicine**, v. 7, n. 12, p. 548-554, 2001.

CALBERG, I.; MANNERVIK, B. Glutathione reductase from rat liver. **Methods Enzymology**, v. 113, p. 484 - 490, 1985.

CARVALHO, F. C.; BARBIA, M. S.; HUGO, V.; V. SARMENTOB; CHIAVACCIA, L. A.; NETTOC, F. M.; GREMIÃO, M. P. D. Surfactant systems for nasal zidovudine delivery: structural, rheological and mucoadhesive properties. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, p. 430 – 439, 2010.

CARVALHO, F. C.; CAMPOS, M. L.; PECCININI, R. G.; GREMIÃO, M. P. D. Nasal administration of liquid crystal precursor mucoadhesive vehicle as an alternative antiretroviral therapy. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 84, n. 1, p. 219-227, 2013. ISSN 0939-6411.

CHAKRABORTY, S.; SHUKLA, D.; MISHRA, B.; SINGH, S. Lipid – An emerging platform for oral delivery of drugs with poor bioavailability. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 72, p. 1–15, 2009.

CHAUHAN, V.; CHAUHAN, A. Oxidative stress in Alzheimer's disease. **Pathophysiology**, v. 13, p. 195-208, 2006.

CHIEN, Y. W.; CHANG, S. F. Intranasal drug delivery for systemic medications. **Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems**, p. 67 - 194, 1987.

COSTANTINO, H. R.; ILLUM, L.; BRANDT, G.; JOHNSON, P. H.; QUAY, S. C. Intranasal delivery: Physicochemical and therapeutic aspects. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 337, n. 1-2, p. 1-24, 2007.

COYLE, J. T.; PRICE, D. L.; DELONG, M. R. Alzheimer's disease: a disorder of cortical cholinergic innervation. **Science**, v. 219, p. 1184-1190, 1983.

COZZI, R.; RICORDY, R.; F. BARTOLINI, L.; RAMADORI, P.; PERTICONE; R. DE SALVIA. Taurine and ellagic acid: two differently-acting natural antioxidants. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, p. 248-254, 1995.

CSÁKI, K. F. Synthetic surfactant food additives can cause intestinal barrier dysfunction. **Medical hypotheses**, v. 76, n. 5, p. 676-681, 2011.

CUTLER, R. G.; KELLY, J.; STORIE, K.; PEDERSEN, W. A.; TAMMARA, A.; K.HATANPAA; TRONCOSO, J. C.; MATTSON, M. P. Involvement of oxidative stress-induced abnormalities in ceramide and cholesterol metabolism in brain aging and Alzheimer's disease. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, p. 2070-2075, 2004.

DALPIAZ, A.; GAVINI, E.; COLOMBO, G.; RUSSO, P.; BORTOLOTTI, F.; FERRARO, L.; TANGANELLI, S.; SCATTURIN, A.; MENEGATTI, E.; GIUNCHEDI, P. Brain Uptake of an Anti-Ischemic Agent by Nasal Administration of

Microparticles. **PHARMACEUTICAL NANOTECHNOLOGY**, v. 97, n. 11, p. 4889-4903, 2007.

DAWIDOWICZ, A. L.; WIANOWSKA, D.; OLSZOWY, M. On practical problems in estimation of antioxidant activity of compounds by DPPH method (Problems in estimation of antioxidant activity). **Food Chemistry**, v. 131, n. 3, p. 1037-1043, 2012.

DEMUS, D.; GOODBY, J. W.; GRAY, G.; SPIESS, H. W.; VILL, V. **Handbook of Liquid Crystals**. Berlin: Wiley-VCH: 1998.

DEVLIN, T. M.; MICHELACCI, Y. M. **Manual de bioquímica com correções clínicas**. 5. São Paulo: Edgar Blücher LTDA, 2002.

DOUGLAS, C. R. **Tratado de fisiologia aplicada às ciências médicas**. 6. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.

DOYLE, B.; GRIFFITHS, L. A. The metabolism of ellagic acid in the rat. **Xenobiotica**, v. 10, p. 247-256, 1980.

DRINGEN, R.; HIRRLINGER, J. Glutathione pathways in the brain. **Biological Chemistry**, v. 384, p. 505-516, 2003.

EKELUND, K.; ÖSTH, K.; PÅHLSTORP, C.; BJÖRK, E.; ULVENLUND, S.; JOHANSSON, F. Correlation between epithelial toxicity and surfactant structure as derived from the effects of polyethyleneoxide surfactants on caco-2 cell monolayers and pig nasal mucosa. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 94, n. 4, p. 730-744, 2005.

ELLMAN, G. L. Tissue sulfhydryl groups. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 82, n. 1, p. 70-77, 1959.

ELLMAN, G. L.; COURTNEY, K. D.; JR., V. A.; FEATHERSTONE, R. M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical Pharmacology**, v. 7, p. 88-95, 1961.

ENGELHARDT, B.; SOROKIN, L. The blood-brain and the blood-cerebrospinal fluid barriers: function and dysfunction. **Seminars in Immunopathology**, v. 31, p. 497-511, 2009.

EXPONENT-LITE. Software: introduction to texture analysis. In: (Ed.). Version 4,5 [SI]: TA-XTPlus, Stable Micro Systems, 2009.

FARRER, L. A.; CUPPLES, L. A.; HAINES, J. L.; HYMAN, B.; KUKULL, W. A.; MAYEUX, R.; MYERS, R. H.; PERICAK-VANCE, M. A.; DUIJN, C. M. V. Effects of age, sex, and ethnicity on the association between apolipoprotein E genotype and Alzheimer disease. A meta-analysis. APOE and Alzheimer Disease Meta Analysis Consortium. **JAMA journal**, v. 278, p. 1349–1356, 1997.

FENG, Y.; YANG, S.-G.; DU, X.-T.; ZHANG, X.; SUN, X.-X.; ZHAO, M.; SUN, G.-Y.; LIU, R.-T. Ellagic acid promotes A $\beta$ 42 fibrillization and inhibits A $\beta$ 42-induced neurotoxicity. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 390, n. 4, p. 1250-1254, 2009.

FILHO, G. B. **Bogliolo Patologia**. 8. Rio de Janeiro: G, 2011.

FISHER, A. Cholinergic treatments with emphasis on m1 muscarinic agonists as potential disease-modifying agents for Alzheimer's disease. **Neurotherapeutics**, p. 433–442, 2008.

FRESCO, P.; BORGES, F.; DINIZ, C.; MARQUES, M. P. New insights on the anticancer properties of dietary polyphenols. **Medicinal Research Reviews**, v. 26, p. 747-766, 2006

FURUKAWA-HIBI, Y.; ALKAM, T.; NITTA, A.; MATSUYAMA, A.; MIZOGUCHI, H.; SUZUKI, K.; MOUSSAOUI, S.; YU, Q. S.; GREIG, N. H.; NAGAI, T.; YAMADA, K. Butyrylcholinesterase inhibitors ameliorate cognitive dysfunction induced by amyloid- $\beta$  peptide in mice. **Behavioural Brain Research**, v. 225, p. 222-229, 2011.

GALLAGHER, M.; COLOMBO, P. J. Ageing: the cholinergic hypothesis of cognitive decline. **Current Opinion in Neurobiology**, v. 5, n. 2, p. 161-168, 1995.

GAO, X.; WU, B.; ZHANG, Q.; CHEN, J.; ZHU, J.; ZHANG, W.; RONG, Z.; CHEN, H.; JIANG, X. Brain delivery of vasoactive intestinal peptide enhanced with the nanoparticles conjugated with wheat germ agglutinin following intranasal administration. **Journal of Controlled Release**, v. 121, p. 156-167, 2007.

GLENNER, G. G. Alzheimer's disease. The commonest form of amyloidosis. **Arch. Pathol. Lab. Med.**, v. 107, 1983.

GOLAN, D. E.; CAIRO, C. W.; SIMON, J. B. **Princípios de Farmacologia: A Base Fisiopatológica da Farmacoterapia**. 3ª edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009.

GÓMEZ-ISLA, T.; HOLLISTER, R.; WEST, H.; MUI, S.; GROWDON, J. H.; PETERSEN, R. C.; PARISI, J. E.; HYMAN, B. T. Neuronal loss correlates with but exceeds neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. **Annals of Neurology**, v. 41, p. 17-24, 1997.

GOSENCA, M.; BESTER-ROGAC, M.; GASPERLIN, M. Lecithin based lamellar liquid crystals as a physiologically acceptable dermal delivery system for ascorbyl palmitate. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 50, n. 1, p. 114-122, 2013.

GRAEBER, M. B.; KÖSEL, S.; EGENSPERGER, R.; BANATI, R. B.; MÜLLER, U.; BISE, K.; HOFF, P.; MÖLLER, H.; FUJISAWA, K.; MEHRAËIN, P. Rediscovery of the case describe by Alois Alzheimer in 1911: historical, histological and molecular genetic analysis. **Neurogenetics**, v. 1, n. 1, p. 73 - 80, 1997.

GRUNDKE-IQBAL; IQBAL, K.; TUNG, Y. C.; QUINLAN, M.; WISNIEWSKI, H. M.; BINDER, L. I. Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, p. 4913-4917, 2006.

GUO, C.; WANG, J.; CAO, F.; LEE, R. J.; ZHAI, G. Lyotropic liquid crystal systems in drug delivery. **Drug Discovery Today**, v. 15, p. 1032 - 1040, 2010.

HALLIWELL, B. Role of free radicals in the neurodegenerative diseases: therapeutic implications for antioxidant treatment. **Drugs Aging** v. 18, p. 685–716, 2001.

HARDY, J. Molecular genetics of Alzheimer's disease. **Acta Neurol. Scand. Suppl.**, v. 165, p. 13–17, 1996.

HARRER, J. G.; THOMAS, L.; MEYERSON, M. **WHAT IS OLFACTION?** 2014.

HARRINGTON, C. R. The etiology of Alzheimer's Disease: Diverse Routes into a Common Tau Pathway p. 97-132, 2001.

HARTMAN, R. E.; SHAH, A.; FAGAN, A. M.; SCHWETYE, K. E.; PARSADANIAN, M.; SCHULMAN, R. N.; FINN, M. B.; HOLTZMAN, D. M. Pomegranate juice decreases amyloid load and improves behavior in a mouse model of Alzheimer's disease. **Neurobiology of Disease**, v. 24, n. 3, p. 506-515, 2006.

HAWKINS, B. T.; DAVIS, T. P. The Blood-Brain Barrier/Neurovascular Unit in Health and Disease. **Pharmacological Reviews**, v. 57, n. 2, p. 173–185, 2005.

HERSHKO, C. Mechanism of iron toxicity and its possible role in red cell membrane damage. **Seminars in Hematology**, v. 26, p. 277-285, 1989.

HERZ, J.; BEFFERT, U. Apolipoprotein e receptors: Linking brain development and Alzheimer's disease. **Nature Reviews**, v. 1, p. 51-58, 2000.

HOLMBERG, K. **Handbook of Applied Surface and Colloid Chemistry**. New York: John Wiley & Sons, 2001.

HSIAO, K.; CHAPMAN, P.; NILSEN, S.; ECKMAN, C.; HARIGAYA, Y.; YOUNKIN, S.; YANG, F.; COLE, G. Correlative memory deficits, A $\beta$  elevation, and amyloid plaques in transgenic mice. **Science**, v. 274, p. 99-102, 1996.

HUANG, X.; ATWOOD, C. S.; HARTSHORN, M. A.; MULTHAUP, G.; GOLDSTEIN, L. E.; SCARPA, R. C.; CUAJUNGCO, M. P.; GRAY, D. N.; LIM, J.; MOIR, R. D.; TANZI, R. E.; BUSH, A. I. The A $\beta$  Peptide of Alzheimer's Disease Directly Produces Hydrogen Peroxide through Metal Ion Reduction. **Biochemistry**, v. 38, p. 7609–7616, 1999.

HUSSEIN, M. Z.; ALI, S. H. A.; ZAINAL, Z.; HAKIM, M. N. Development of antiproliferative nanohybrid compound with controlled release property using ellagic acid as the active agent. **International Journal of Nanomedicine**, v. 6, p. 1373–1383, 2011.

HUTTON, M.; HARDY, J. The presenilins and Alzheimer's disease. **Hum. Mol. Genet.**, v. 6, p. 1639–1646, 1997.

IBGE. INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Censo demográfico**, 2012. Disponível em: < <http://www.ibge.com.br> >. Acesso em: 20/09/2012.

ILLUM, L. Transport of drugs from the nasal cavity to the central nervous system. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 11, n. 1, p. 1-18, 2000.

JHOO, J. H.; KIM, H. C.; NABESHIMA, T.; YAMADA, K.; SHIN, E. J.; JHOO, W. K.; KIM, W.; KANG, K. S.; JO, S. A.; WOO, J. I. Beta-amyloid (1-42)-induced learning and memory deficits in mice: involvement of oxidative burdens in the hippocampus and cerebral cortex. **Behavioural Brain Research Journal**, v. 155, p. 185–196, 2004.

JOGANI, V. V.; SHAH, P. J.; MISHRA, P.; MISHRA, A. K.; MISRA, A. R. Intranasal Mucoadhesive Microemulsion of Tacrine

to Improve Brain Targeting. **Alzheimer Dis Assoc Disord**, v. 22, n. 2, p. 116 - 124, 2008.

JONES, D. S.; WOOLFSON, A. D.; BROWN, A. F.; COULTER, W. A.; MCCLELLAND, C.; IRWIN, C. R. Design, characterisation and preliminary clinical evaluation of a novel mucoadhesive topical formulation containing tetracycline for the treatment of periodontal disease. **J. Control. Release**, v. 67, p. 357–368, 2000.

JOSEPH, T. B.; WANG, S. W.; LIU, X.; KULKARNI, K. H.; WANG, J.; XU, H.; HU, M. Disposition of flavonoids via enteric recycling: enzyme stability affects characterization of prunetin glucuronidation across species, organs, and UGT isoforms. **Molecular Pharmaceutics**, v. 4, p. 883–894, 2007.

KANDIMALLA, K. K.; DONOVAN, M. D. Transport of hydroxyzine and triprolidine across bovine olfactory mucosa: Role of passive diffusion in the direct nose-to-brain uptake of small molecules. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 302, n. 1–2, p. 133–144, 2005.

KAUR, S.; GROVER, I. S.; KUMAR, S. Antimutagenic potential of ellagic acid isolated from *Terminalia arjuna* **Indian J. Exp. Biol**, p. 478–482, 1997.

KAY, C. D. The future of flavonoid research. **British Journal of Nutrition**, v. 104 (Suppl 3), p. S91–S95, 2010.

KHADEM, S.; MARLES, R. J. Monocyclic Phenolic Acids; Hydroxy- and Polyhydroxybenzoic Acids: Occurrence and Recent Bioactivity Studies. **Molecules**, v. 15, p. 7985-8055, 2010.

KIM, H. C.; YAMADA, K.; NITTA, A.; OLARIU, A.; TRAN, M. H.; MIZUNO, M.; NAKAJIMA, A.; NAGAI, T.; KAMEI, H.; JHOO, W. K.; D.H. IM, E. J. S.; HJELLE, O. P.; OTTERSEN, O. P.; PARK, S. C.; KATO, K.; MIRAULT, M. E.; T.NABESHIMA. Immunocytochemical evidence that amyloid beta (1-42) impairs

endogenous antioxidant systems in vivo. **Neuroscience**, n. 119, p. 399–419, 2003.

KIM, J.-K.; NOH, J. H.; LEE, S.; CHOI, J. S.; SUH, H.; CHUNG, H. Y.; SONG, Y.-O.; CHOI, W. C. The First Total Synthesis of 2,3,6-Tribromo-4,5-dihydroxybenzyl Methyl Ether (TDB) and Its Antioxidant Activity. **Bulletin of the Korean Chemical Society**, v. 23, n. 5, p. 661 - 662, 2002.

KIMURA, M.; KOMATSU, H.; OGURA, H.; SAWADA, K. Comparison of donepezil and memantine for protective effect against amyloidbeta(1-42) toxicity in rat septal neurons. **Neuroscience Letters**, v. 391, p. 17–21, 2005.

KLANG, S.; BENITA, S. Design and evaluation of submicron emulsion as colloidal drug carries for intravenous administration. In: (Ed.). **Submicron emulsions in drug targeting and delivery** Harwood academic publishers, 1998. p.119-146.

KOPKE, E.; TUNG, Y. C.; SHAIKH, S.; ALONSO, A. C.; IQBAL, K.; GRUNDKE-IQBAL, I. Microtubule-associated protein tau. Abnormal phosphorylation of a non-paired helical filament pool in Alzheimer disease. **J. Biol. Chem**, v. 268, p. 24374–24384, 1993.

KUMAR, M.; MISRA, A.; BABBAR, A. K.; MISHRA, A. K.; MISHRA, P.; PATHAK, K. Intranasal nanoemulsion based brain targeting drug delivery system of risperidone. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 358, n. 1–2, p. 285-291, 2008.

KUMAR, S.; BROCK, J. B.; FINOTELLO, D.; FISCH, M.; GARLAND, C.; HO, J.; NEUBERT, M.; PANDULKA, B.; PHOTINOS, P.; SINHA, S.; UKLEJA, D. **Liquid Crystals: Experimental study of physical properties and phase transitions** 1ª edição. Nova York: Cambridge University Press, 2001.

LAFERLA, F. M.; GREEN, K. N. Animal Models of Alzheimer Disease. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, p. 1-13, 2012.

LAGERWALL, J. P. F.; SCALIA, G. A new era for liquid crystal research: Applications of liquid crystals in soft matter nano-, bio- and microtechnology. **Current Applied Physics**, v. 12, p. 1387-1412, 2012.

LALLEMAND, F.; DAULL, P.; SIMONBENITA; BUGGAGE, R.; JEAN-SEBASTIENGARRIGUE. Successfully Improving Ocular Drug Delivery Using the Cationic Nanoemulsion, Novasorb. **Journal of Drug Delivery**, p. 1-16, 2012.

LAUDERBACK, C. M.; HARRIS-WHITE, M. E.; WANG, Y.; JR., N. W. P.; CARNEY, J. M.; BUTTERFIELD, D. A. Amyloid  $\beta$ -peptide inhibits Na<sup>+</sup>- dependent glutamate uptake. **Life Sciences**, v. 65, p. 1977-1981, 1999.

LAURSEN, S. E.; BELKNAP, J. K. Intracerebroventricular injections in mice. Some methodological refinements. **Journal of Pharmacological Methods**, v. 16, p. 355 - 357, 1986.

LAWRENCE, M. J.; REES, G. D. Microemulsion-based media as novel drug delivery systems. **Advanced Drug Delivery Reviews**, p. 89 – 121, 2000.

LAWRENCE, M. J.; REES, G. D. Microemulsion-based media as novel drug delivery systems. **Advanced Drug Delivery Reviews**, p. 175–193, 2012.

LEE, C. H.; MOTURIA, V.; LEE, Y. Thixotropic property in pharmaceutical formulations. **Journal of Controlled Release**, v. 136, p. 88–98, 2009.

LEE, J. W.; PARK, J. H.; ROBINSON, J. Bioadhesive-based dosage forms: the next generation. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 89, p. 850-866, 2000.

LISTER, R. G. The use of plus-maze to measure anxiety in the mouse. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 92, n. 2, p. 180 - 185, 1987.

LOVELL, M. A.; EHMANN, W. D.; BUTLER, S.; MARKESBERY, W. R. Elevated thiobarbituric acid-reactive substances and antioxidant enzyme activity in the brain in Alzheimer's disease. **Neurology**, p. 1594-1601, 1995.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 193, n. 1, p. 265-275, 1951.

LYNCH, P. J. Head anatomy with olfactory nerve. Olfactory bulb labeled in Japanese., 2006. Disponível em: <  
[http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Head\\_olfactory\\_nerve -  
\\_olfactory\\_bulb\\_ja.jpg](http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Head_olfactory_nerve_-_olfactory_bulb_ja.jpg)>.

MAA, Y. F.; HSU, C. C. Performance of sonication and microfluidization for liquid-liquid emulsification. **Pharmaceutical Research and Development**, v. 4, n. 2, p. 233-240, 1999.

MANDAL, S.; MANDAL, S. D. Design and development of carbamazepinemuchoadesive microemulsion for intranasal delivery: an ex-vivo study., v. 3, n. 1, p. 56 - 60, 2010.

MARTINI, E.; CARVALHO, E.; TEIXEIRA, H.; LEÃOI, F.; OLIVEIRA, M. C. D. Adsorção de oligonucleotídeos em nanoemulsões obtidas por emulsificação espontânea. **Química Nova**, v. 30, n. 4, 2007.

MARTINI, É.; FATTAL, E.; DE OLIVEIRA, M. C.; TEIXEIRA, H. Effect of cationic lipid composition on properties of oligonucleotide/emulsion complexes: Physico-chemical and release studies. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 352, n. 1-2, p. 280-286, 2008.

MASLOW, K. 2010 Alzheimer's disease facts and figures. **Alzheimer's & Dementia**, v. 6, p. 158–194, 2010.

MCDANIEL, D. H.; NEUDECKER, B. A.; DINARDO, J. C.; LEWIS, J. A.; MAIBACH, H. Clinical efficacy assessment in photodamage skin of 0,5% and 1,0% idebenone. **Journal of Cosmetic Dermatology**, p. 167 - 173, 2005.

MCDONALD, M. P.; DAHL, E. E.; OVERMIER, Y. B.; BANDYOPADHYAY, S.; BABCOCK, D.; CLEARY, J. Reversal of b-amyloid-induced retention deficit after exposure to training and state cues. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 65, p. 35-47, 1996.

MEDEIROS, R.; PREDIGER, R. D. S.; PASSOS, G. F.; PANDOLFO, P.; DUARTE, F. S.; FRANCO, J. L.; DAFRE, A. L.; DI GIUNTA, G.; FIGUEIREDO, C. P.; TAKAHASHI, R. N.; CAMPOS, M. M.; CALIXTO, J. B. Connecting TNF- alpha Signaling Pathways to iNOS Expression in a Mouse Model of Alzheimer's Disease: Relevance for the Behavioral and Synaptic Deficits Induced by Amyloid  $\beta$  Protein. **Neurobiology of Disease**, p. 5394 - 5404, 2007.

MIMICA-DUKIĆ, N.; SIMIN, N.; SVIRČEV, E.; ORČIĆ, D.; BEARA, I.; LESJAK, M.; BOŽIN, B. **The Effect of Plant Secondary Metabolites on Lipid Peroxidation and Eicosanoid Pathway**: 193-210 p. 2013.

MISTRY, A.; STOLNIK, S.; ILLUM, L. Nanoparticles for direct nose-to-brain delivery of drugs. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 379, p. 146–157, 2009.

MOLYNEUX, P. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. **Songklanakarin Journal Science Technology**, v. 26, p. 211 - 219, 2004.

MOLZ, S.; DECKER, H.; OLIVEIRA, I. J. L.; SOUZA, D. O.; TASCA, C. I. Neurotoxicity Induced by Glutamate in Glucose-

Deprived Rat Hippocampal Slices is Prevented by GMP. **NEUROCHEMICAL RESEARCH**, v. 30, n. 1, p. 83 - 89, 2005.

MORRIS, R. G.; GARRUD, M. P.; RAWLINS, J. N. P.; O'KEEFE, J. Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. **Nature**, v. 297, p. 681 - 683, 1982.

MORRISON, E. E.; CONSTANZO, R. M. Morphology of human olfactory epithelium. **J Comp Neurol**, p. 1 -13, 1990.

MUÑOZ-MUÑOZ, J. L.; GARCIA-MOLINA, F.; GARCIA-MOLINA, M.; TUDELA, J.; CÁNOVAS, F. G.; RODRIGUEZ-LOPEZ, J. N. Ellagic Acid: Characterization as Substrate of Polyphenol Oxidase. **Research Communication**, v. 61, p. 171–177, 2009.

MURUGAN, V.; MUKHERJEE, K.; MAITI, K.; MUKHERJEE, P. Enhanced Oral Bioavailability and Antioxidant Profile of Ellagic Acid by Phospholipids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, p. 4559 - 4565, 2009.

MYERS, A. J.; GOATE, A. M. The genetics of late onset Alzheimer's disease. **Curr. Opin. Neurol.**, v. 14, p. 433–440, 2001.

NAGY, Z.; ESIRI, M. M.; JOBST, K. A.; MORRIS, J. H.; KING, E. M.; MCDONALD, B.; LITCHFIELDS; SMITH, A.; BARNETSON, L.; SMITH, A. D. Relative roles of plaques and tangles in the dementia of Alzheimer's disease: correlations using three sets of neuropathological criteria. v. 6, p. 21-31, 1995.

NGUYEN, T.-H.; HANLEY, T.; PORTERA, C. J. H.; BOYD, B. J. Nanostructured liquid crystalline particles provide long duration sustained-release effect for a poorly water soluble drug after oral administration. **Journal of Controlled Release**, v. 153, n. 2, p. 180–186, 2011.

NICOLI, M. C.; ANESE, M.; PARPINEL, M. Influence of processing on the antioxidant properties of fruit and vegetables.

**Trends in Food Science and Technology**, v. 10, p. 94–100, 1999.

NITTA, A.; ITOH, A.; HASEGAWA, T.; NABESHIMA, T.  $\beta$ -Amyloid protein induced Alzheimer's disease animal model. **Neuroscience Letters**, v. 170, p. 63-66, 1994.

OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Analytical Biochemistry**, v. 95, p. 351–358, 1979.

PARDRIDGE, W. M. Non-invasive drug delivery to the human brain using endogenous blood–brain barrier transport systems. **Pharmaceutical Science & Technology Today**, p. 49-59, 1999.

PARDRIDGE, W. M.; GOLDEN, P. L. **Drug Delivery and Targeting for Pharmacists and Pharmaceutical Scientists**. Nova lorque: Taylor & Francis: 319-333 p. 2001.

PARK, L.; ANRATHER, J.; FORSTER, C.; KAZAMA, K.; CARLSON, G. A.; IADECOLA, C. Abeta-induced vascular oxidative stress and attenuation of functional hyperemia in mouse somatosensory cortex. **Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism**, n. 24, p. 334–342, 2004.

PETRONILHO, E. D. C.; PINTO, A. C.; VILLAR, J. D. F. **ACETILCOLINESTERASE: ALZHEIMER E GUERRA QUÍMICA**: 1-12 p. 2013.

PEY, C. M.; MAESTRO, A.; I.SOLÉ; GONZÁLEZ, C.; SOLANS, C.; GUTIÉRREZ, J. M. Optimization of nano-emulsions prepared by low-energy emulsification methods at constant temperature using a factorial design study. **Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects**, p. 144 – 150, 2006.

PIERMARTIRI, T. C. B.; FIGUEIREDO, C. P.; RIAL, D.; DUARTE, F. S.; BEZERRA, S. C.; MANCINI, G.; DE BEM, A. F.; PREDIGER, R. D. S.; TASCA, C. I. Atorvastatin prevents hippocampal cell death, neuroinflammation and oxidative stress

following amyloid- $\beta$ 1–40 administration in mice: Evidence for dissociation between cognitive deficits and neuronal damage. **Experimental Neurology**, v. 226, n. 2, p. 274–284, 2010.

PIRES, A.; FORTUNA, A.; ALVES, G.; FALCÃO, A. Intranasal Drug Delivery: How, Why and What for? **Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 12, n. 3, p. 288 - 311, 2009.

PREDIGER, R. D. S.; FRANCO, J. L.; PANDOLFO, P.; MEDEIROS, R.; DUARTE, F. S.; DI GIUNTA, G.; FIGUEIREDO, C. P.; FARINA, M.; CALIXTO, J. B.; TAKAHASHI, R. N.; DAFRE, A. L. Differential susceptibility following  $\beta$ -amyloid peptide-(1–40) administration in C57BL/6 and Swiss albino mice: Evidence for a dissociation between cognitive deficits and the glutathione system response. **Behavioural Brain Research**, v. 177, n. 2, p. 205–213, 2007.

PREDIGER, R. D. S.; MEDEIROS, R.; PANDOLFO, P.; DUARTE, F. S.; PASSOS, G. F.; PESQUERO, J. B.; CAMPOS, M. M.; CALIXTO, J. B.; TAKAHASHI, R. N. Genetic deletion or antagonism of kinin B1 and B2 receptors improves cognitive deficits in a mouse model of Alzheimer's disease. **Neuroscience**, v. 151, n. 3, p. 631–643, 2008.

PRIYADARSINI, K. I.; KHOPDE, S. M.; KUMAR, S. S.; MOHAN, H. Free radical studies of ellagic acid, a natural phenolic antioxidant. **J. Agric. Food Chem**, p. 2200–2206, 2002.

PubChem Compound 2013. Disponível em: <  
<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/rest/chemical/5281855#x291>>.

RABINOVICH-GUILATTA, L.; COUVREURA, P.; LAMBERTB, G.; GOLDSTEINC, D.; BENITAC, S.; DUBERNET, C. Extensive surface studies help to analyse zeta potential data: the case of cationic emulsions. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 131, n. 13, p. 1–13, 2004.

RAMASSAMY, C. Emerging role of polyphenolic compounds in the treatment of neurodegenerative diseases: A review of their

intracellular targets. **European Journal of Pharmacology**, v. 545, p. 51–64, 2006.

RAMOS, S. Effects of dietary flavonoids on apoptotic pathways related to cancer chemoprevention. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 18, p. 427–442, 2007.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M. **Farmacologia**. Guanabara Koogan. Rio de Janeiro: 2001.

RATNAM, D. V.; ANKOLA, D. D.; BHARDWAJ, V.; SAHANA, D. K.; KUMAR, M. N. V. R. Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: A pharmaceutical perspective. **Journal of Controlled Release**, v. 113, n. 3, p. 189-207, 2006.

REISBERG, B.; DOODY, R.; STÖFFLER, A.; SCHMITT, F.; FERRIS, S.; MÖBIUS, H. Memantine in moderate-to-severe Alzheimer's disease. **The New England Journal of Medicine**, v. 348, n. 14, p. 1333–1341, 2003.

RISAU, W. Differentiation of endothelium. **FASEB Journal**, v. 9, p. 926-933, 1995.

ROGERIO, A. P.; FONTANARI, C.; MELO, M. C.; AMBROSIO, S. R.; SOUZA, G. E. D.; P. S. PEREIRA; FRANCA, S. C.; COSTA, F. B. D.; ALBUQUERQUE, D. A.; FACCIOLI, L. H. Anti-inflammatory analgesic and anti-oedematous effects of Lafoensia pacariextract and ellagic acid. **J. Pharm. Pharmacol**, p. 1265–1273, 2006.

SANTOS, D. B.; PERES, K. C.; RIBEIRO, R. P.; COLLE, D.; SANTOS, A. A. D.; MOREIRA, E. L. G.; SOUZA, D. O. G.; FIGUEIREDO, C. P.; FARINA, M. Probucol, a lipid-lowering drug, prevents cognitive and hippocampal synaptic impairments induced by amyloid  $\beta$  peptide in mice. **Experimental Neurology**, v. 233, p. 767–775, 2012.

SANTOS, V. V.; SANTOS, D. B.; LACH, G.; RODRIGUES, A. L. S.; FARINA, M.; LIMA, T. C. M. D.; PREDIGER, R. D.

Neuropeptide Y (NPY) prevents depressive-like behavior, spatial memory deficits and oxidative stress following amyloid- $\beta$  (A $\beta$ 1–40) administration in mice. **Behavioural Brain Research**, v. 244, p. 107–115, 2013.

SCHIPPER, N. G.; VERHOEF, J. C.; MERKUS, F. W. The nasal mucociliary clearance: Relevance to nasal drug delivery. **Pharmaceutical Research**, p. 807-814, 1991.

SEERAM, N. P.; LEE, R.; HEBER, D. Bioavailability of ellagic acid in human plasma after consumption of ellagitannins from pomegranate (*Punica granatum*L.) juice. **Clinica Chimica Acta**, v. 348, p. 63–68, 2004.

SELKOE, D. J. Translating cell biology into therapeutic advances in Alzheimer's disease. **Nature**, v. 399, p. A23- A31, 1999.

SERRA, L.; DOMÉNECH, J.; PEPPAS, N. A. Engineering design and molecular dynamics of mucoadhesive drug delivery systems as targeting agents. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 71, n. 3, p. 519-528, 2009.

SHAH, R. S.; LEE, H. G.; XIONGWEI, Z.; PERRY, G.; SMITH, M. A.; CASTELLANI, R. J. Current approaches in the treatment of Alzheimer's disease. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 62, n. 4, p. 199–207, 2008.

SHARMA, G.; ITALIA, J. L.; SONAJE, K.; TIKOO, K.; KUMAR, M. N. V. R. Biodegradable in situ gelling system for subcutaneous administration of ellagic acid and ellagic acid loaded nanoparticles: Evaluation of their antioxidant potential against cyclosporine induced nephrotoxicity in rats. **Journal of Controlled Release**, v. 118, p. 27–37, 2007.

SILVA, C.; MARTINI, E.; TAVARES, G.; SILVEIRA, T.; OLIVEIRA, M. C. D.; TEIXEIRA, H. Caracterização Físico-química de Nanoemulsões Catiônicas como Sistemas de Liberação de Oligonucleotídeos. **Acta Farm. Bonaerense**, v. 25, p. 17-21, 2006.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, P. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 6. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade UFRGS/Ed. da UFSC, 2007.

SINKO, J. P. **Martin: físico-farmácia e ciências farmacêuticas**. São Paulo: Artmed, 2008. 809

SISODIA, S. S.; PRICE, D. L. Role of the beta-amyloid protein in Alzheimer's disease. **The FASEB Journal**, v. 9, p. 366 - 370, 1995.

SMART, J. D. The basics and underlying mechanisms of mucoadhesion. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 57, p. 1556 – 1568, 2005.

SMITH, C.; MARKS, A. D.; LIEBERMANN, M. **Bioquímica Médica Básica de Marks**. 2. São Paulo: Artmed, 2007.

SOLANS, C.; IZQUIERDO, P.; NOLLA, J.; AZEMAR, N.; GARCIA-CELMA, M. J. Nano-emulsions. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 10, n. 3-4, p. 102–110, 2005.

SONAJE, K.; ITALIA, J. L.; SHARMA, G.; BHARDWAJ, V.; TIKOO, K.; KUMAR, M. N. V. R. Development of Biodegradable Nanoparticles for Oral Delivery of Ellagic Acid and Evaluation of Their Antioxidant Efficacy Against Cyclosporine A-Induced Nephrotoxicity in Rats. **Pharmaceutical Research**, v. 24, n. 5, p. 899 - 908, 2007.

SONVICO, F.; CAGNANI, A.; ROSSI, A.; MOTTA, S.; BARI, M. T. D.; CAVATORTA, F.; ALONSO, M. J.; DERIU, A.; COLOMBO, P. Formation of self-organized nanoparticles by lecithin/chitosan ionic interaction. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 324, p. 67–73, 2006.

SOBRATTEE, M. A.; NEERGHEEN, V. S.; LUXIMON-RAMMA, A.; ARUOMA, O. I.; BAHORUN, T. Phenolics as potential

antioxidant therapeutic agents: mechanism and actions. **Mutation Research**, v. 579, p. 200–213, 2005.

SOOD, S.; JAIN, K.; GOWTHAMARAJAN, K. Optimization of curcumin nanoemulsion for intranasal delivery using design of experiment and its toxicity assessment. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 113, p. 330– 337, 2014.

SPIGNO, G.; DONSI, F.; AMENDOLA, D.; SESSA, M.; FERRARI, G.; DE FAVERI, D. M. Nanoencapsulation systems to improve solubility and antioxidant efficiency of a grape marc extract into hazelnut paste. **Journal of Food Engineering**, v. 114, n. 2, p. 207-214, 2013.

STERU, L.; CHERMAT, R.; THIERRY, B.; SIMON, P. The tail suspension test: A new method for screening antidepressants in mice. **Psychopharmacology**, v. 85, n. 3, p. 367-370, 1985.

SUBBARAO, K. V.; RICHARDSON, J. S.; ANG, L. C. Autopsy samples of Alzheimer's cortex show increased peroxidation in vitro. **Journal of Neurochemistry**, v. 55, p. 342–345, 1990.

SWAMY, N. G. N.; ABBAS, Z. Mucoadhesive in situ gels as nasal drug delivery systems: an overview. **Asian Journal of Pharmaceutical Sciences**, p. 168 - 180, 2012.

TABNER, B. J.; TURNBULL, S.; KING, J. E.; BENSON, F. E.; EL-AGNAF, O. M.; ALLSOP, D. A spectroscopic study of some of the peptidyl radicals formed following hydroxyl radical attack on beta-amyloid and alpha-synuclein. **Free Radical Research**, v. 40, p. 731-739, 2006.

TADROS, T.; IZQUIERDO, P.; ESQUENA, J.; SOLANS, C. Formation and stability of nano-emulsions. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 108-109, p. 303–318, 2004.

TAMILVANAN, S.; SENTHILKUMAR, S. R.; BASKAR, R.; SEKHARAN, T. R. Manufacturing techniques and excipients used during the formulation of oil-in-water type nanosized emulsions

for medical applications. **J. Excipients and Food Chem**, p. 11 - 29, 2010.

TAYEB, H. O.; YANG, H. D.; PRICE, B. H.; TARAZI, F. I. Pharmacotherapies for Alzheimer's disease: Beyond cholinesterase inhibitors. **Pharmacology & Therapeutics**, n. 134, p. 8–25, 2012.

TEEL, R. W. DISTRIBUTION AND METABOLISM OF ELLAGIC ACID IN THE MOUSE FOLLOWING INTRAPERITONEAL ADMINISTRATION **Cancer Letters**, v. 34, p. 165 - 171, 1987.

TEEL, R. W.; MARTIN, R. M. Disposition of the plant phenol ellagic acid in the mouse following oral administration by gavage. **Xenobiotica**, p. 397-405, 1988.

TONG-UM, T.; MUCHIMAPURA, S.; PHACHONPAI, W.; WATTANATHORN, J. Intranasal Administration of Quercetin Liposome Decreases Anxiety-like Behavior and Increases Spatial Memory. **American Journal of Neuroscience**, v. 1, p. 21 - 27, 2010.

TRIMAILLE, T.; CHAIX, C.; PICHOT, C.; DELAIR, T. Polymer functionalized submicrometric emulsions as potential synthetic DNA vectors. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 258, n. 1, p. 135–145, 2003.

VANDAMME, T. F. Microemulsions as ocular drug delivery systems: recent developments and future challenges. **Progress in Retinal and Eye Research**, v. 21, n. 1, p. 15-34, 2002.

VARUM, F. O.; BASIT, A. W.; SOUSA, J.; VEIGA, F. Estudos de mucoadesão no trato gastrointestinal para o aumento da biodisponibilidade oral de fármacos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 44, p. 535 - 548, 2008.

WANG, F.; HUANG, W.; ZHANG, S.; LIU, G.; LI, K.; TANG, B. Enhancing fluorescence intensity of Ellagic acid in Borax–HCl–

CTAB micelles. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 78, n. 3, p. 1013-1017, 2011.

WATTANATHORN, J.; PHACHONPAI, W.; PRIPREM, A.; SUTHIPARINYANONT, S. Nasal Administration of Quercetin Liposomes Modulate Cognitive Impairment and Inhibit Acetylcholinesterase Activity in Hippocampus. **American Journal of Agricultural and Biological Science**, v. 1, p. 31 - 35, 2007.

WENDEL, A. Glutathione peroxidase. **Methods Enzymology**, v. 77, p. 325 - 333, 1981.

WESTERMAN, M. A.; COOPER-BLACKETER, D.; MARIASH, A.; KOTILINEK, L.; KAWARABAYASHI, T.; YOUNKIN, L. H.; CARLSON, G. A.; YOUNKIN, S. G.; ASHE, K. H. The relationship between Ab and memory in Tg2576 mouse model of Alzheimer's disease. **The Journal of Neuroscience**, v. 22, p. 1858-1867, 2002.

WESTIN, U.; PIRAS, E.; JANSSON, B.; BERGSTROM, U.; DAHLIN, M.; BRITTEBO, E.; BJORK, E. Transfer of morphine along the olfactory pathway to the central nervous system after nasal administration to rodents. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 24, p. 565–573, 2005.

WESTIN, U. E.; BOSTROM, E.; GRASJO, J.; HAMMARLUND-UDENAES, M.; BJORK, E. Direct nose-to-brain transfer of morphine after nasal administration to rats. **Pharmaceutical Research**, v. 23, n. 3, p. 565–572, 2006.

WHITLEY, A. C.; STONER, G. D.; DARBY, M. V.; WALLE, T.; ABBAS, Z. Intestinal epithelial cell accumulation of the cancer preventive polyphenol ellagic acid—extensive binding to protein and DNA. **Biochemical Pharmacology**, p. 907 – 915, 2003.

WILSON, G. N.; MICKLEY, G. A.; MATERA, K. M. The efficacy of ellagic acid in attenuating neurophysiological and cognitive-behavioral symptoms associated with infusion of amyloid-beta (A $\beta$ ) peptide fragments in adult rats. **The Baldwin-Wallace**

**College Journal of Research and Creative Studies**, p. 15-30, 2010.

WISNIEWSKI, H. M.; WEGIEL, J.; KOTULA, L. Some neuropathological aspects of Alzheimer's disease and its relevance to other disciplines. **Neuropathology and Applied Neurobiology**, v. 22, n. 1, p. 3-11, 1996.

WONG, P. T.; WANG, S. H.; CIOTTI, S.; MAKIDON, P. E.; SMITH, D. M.; FAN, Y.; SCHULER, C. F.; BAKER, J. R. Formulation and characterization of nanoemulsion intranasal adjuvants: Effects of surfactant composition on mucoadhesion and immunogenicity. **Molecular and Behavioral Neuroscience Institute**, v. 11, p. 531-544, 2014.

WU, H.; HU, K.; JIANG, X. From nose to brain: understanding transport capacity and transport rate of drugs. . **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 5, n. 10, p. 1159–1168, 2008.

XU, Q.; NAKAJIMA, M.; LIU, Z.; SHIINA, T. Soybean-based Surfactants and Their Applications. 2013. Disponível em: < <http://www.intechopen.com/books/soybean-applications-and-technology/soybeanbased-surfactants-and-their-applications> >.

XU, Z.; SHEN, C.; HOU, Y.; GAO, H.; SUN, S. Oleylamine as Both Reducing Agent and Stabilizer in a Facile Synthesis of Magnetite Nanoparticles. **Chemistry of Materials**, v. 21, p. 1778–1780, 2009.

YANG, C.; TZOU, B.; LIU, Y.; TSAI, M.; SHYUE, S.; TZENG, S. Inhibition of cadmium-induced oxidative injury in rat primary astrocytes by the addition of antioxidants and the reduction of intracellular calcium. **J Cell Biochem**, p. 825–834, 2008.

ZHANG, Q.; JIANG, X.; JIANG, W.; LU, W.; SU, L.; SHI, Z. Preparation of nimodipineloaded microemulsion for intranasal delivery and evaluation on the targeting efficiency to the brain. **International Journal Pharmaceutics**, v. 275, p. 85–96, 2004.

ZHAO, L. N.; LONG, H.; MU, Y.; CHEW, L. Y. The Toxicity of Amyloid  $\beta$  Oligomers. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 13, p. 7303-7327, 2012.

ZHU, X.; RAINA, A. K.; ROTTKAMP, C. A.; ALIEV, G.; PERRY, G.; BOUX, H.; SMITH, M. A. Activation and redistribution of c-jun N-terminal kinase/stress activated protein kinase in degenerating neurons in Alzheimer's disease. **Journal of Neurochemistry**, v. 76, p. 435-441, 2001.