



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS  
MESTRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS  
PRODUÇÃO E CONTROLE DE QUALIDADE DE MEDICAMENTOS

**LINA CLARA GAYOSO E ALMENDRA IBIAPINA MORENO**

**Delineamento e caracterização de lipossomas contendo nimodipina para uso direcionado  
a doenças neurodegenerativas**

**TERESINA – PIAUÍ  
2011**

**LINA CLARA GAYOSO E ALMENDRA IBIAPINA MORENO**

**Delineamento e caracterização de lipossomas contendo nimodipina para uso direcionado  
a doenças neurodegenerativas**

Dissertação, como requisito complementar, para obter o título de Mestre em Ciências Farmacêuticas, submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (PPGCF) da Universidade Federal do Piauí (UFPI).

**Orientador: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Hercília Maria Lins Rolim Santos**

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

**TERESINA - PIAUÍ  
2011**

LINA CLARA GAYOSO E ALMENDRA IBIAPINA MORENO

**Delineamento e caracterização de lipossomas contendo nimodipina para uso direcionado a doenças neurodegenerativas**

**Dissertação defendida sob a avaliação da Comissão Examinadora constituída por:**

Presidente e Examinador Interno: **Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Hercília Maria Lins Rolim Santos**

(Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Piauí)

Assinatura: \_\_\_\_\_

Examinador Externo: **Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Rita de Cássia Meneses Oliveira**

(Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Piauí).

Assinatura: \_\_\_\_\_

Examinador Externo: **Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Nereide Stela Santos Magalhães**

(Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco)

Assinatura: \_\_\_\_\_

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ**

**REITOR**

Prof. Dr. Luiz de Sousa Santos Júnior

**VICE-REITOR**

Prof. Dr. Edwar de Alencar Castelo Branco

**PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO**

Prof. Dr. Saulo Cunha de Serpa Brandão

**DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**

Prof. MSc. Antonio dos Santos Rocha Filho

**VICE-DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**

Prof. Dr. José Guilherme Ferre Pompeu

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

**FARMACÊUTICAS**

Prof. Dr. Rivelilson Mendes de Freitas

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

**FARMACÊUTICAS**

Prof. Dr. Lívio César Cunha Nunes

## **LABORATÓRIOS E INSTITUIÇÕES ENVOLVIDAS**

### **Núcleo de Tecnologia Farmacêutica (NTF) - UFPI**

Responsável: Prof. Dr. Rivelilson Mendes de Freitas

Campus Universitário Ministro Petrônio Portela – Bairro Ininga, Teresina, Piauí, Brasil.

Cep: 64049-550 - Teresina-PI – Brasil.

### **Laboratório de Pesquisa em Neuroquímica Experimental (LAPNEX) – UFPI**

Responsável: Prof. Dr. Rivelilson Mendes de Freitas

Campus Ministro Petrônio Portella, Bairro Ininga, Teresina, Piauí, Brasil.

64.049-550 - Teresina - Piauí, Brasil.

### **Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA) - UFPE**

Responsável: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Nereide Stela Santos Magalhães

Av. Prof. Moraes Rego, S/N. Cidade Universitária.

CEP: 50670-901- Recife – PE

### **Laboratórios do Curso de Farmácia da Universidade Federal do Piauí - UFPI**

Responsável: Prof. Dr. Stanley Juan Chavez Gutierrez

Campus Universitário Ministro Petrônio Portella, Bairro Ininga, Teresina, Piauí, Brasil.

CEP: 64049-550 - Teresina – PI.

*Aos meus Pais, Irmão, Avós, Tios e Primos. Em especial às três mulheres da minha vida: minha mãe Luciana, minha melhor amiga e maior companheira, minha avó Ana Maria por me ensinar o que é amor incondicional e o quanto é bom ser amada dessa forma e minha avó Ezeuda por me mostrar que podemos manter a doçura mesmo quando a vida se mostra amarga.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a **Deus**, por estar sempre comigo e por ter me colocado nos lugares certos nas horas certas.

À Professora Dr.<sup>a</sup> **Hercília Maria Lins Rolim Santos**, minha orientadora e amiga, por ter me introduzido no universo da nanotecnologia, possibilitando a realização desse trabalho e por permitir que essa jornada fosse tão agradável.

Ao Professor Dr. **Rivelilson Mendes de Freitas**, pelo altruísmo de dividir o conhecimento, pela humildade no tratar com os alunos e, sobretudo pela paciência em me escutar e pela imensa disponibilidade de ajudar. O senhor é nosso grande exemplo, obrigada por fazer parte das nossas vidas e nos mostrar o que podemos fazer com esforço e dedicação.

Aos professores Dr. **José Lamartine Soares Sobrinho** e Dr. **Lívio César Cunha Nunes**, professores do programa de pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, pela amizade e apoio nos momentos de dificuldade.

Aos demais colaboradores, por dedicarem tempo e cederem seus laboratórios para realização desta pesquisa, em especial Professora Dr.<sup>a</sup> **Nereide Stela Santos Magalhães**, Professor Dr. **Stanley Juan Chavez Gutierrez** e à Dr.<sup>a</sup> **Adriana da Rocha Tomé**.

Aos **Professores** do programa de pós-graduação em Ciências Farmacêuticas (PPGCF) pelos ensinamentos transmitidos

À minha amiga **Isabella Macário Ferro Cavalcanti**, pela paciência de me repassar as práticas realizadas no laboratório de nanotecnologia e pela enorme dedicação dispensada à minha pesquisa. Sem você a realização desse trabalho seria impossível! Muito obrigada...

Aos colegas **Flávio Alves dos Santos**, **Rusbene Bruno**, **Natan Lourenço** e todos os companheiros do LAPNEX pela ajuda em inúmeros momentos ao longo de mestrado.

Às amigas **Ana Paula dos Santos e Silva**, **Eliamara Barroso Sabino**, **Dayane Alves Costa** e **Jéssica Pereira Costa** pela amizade, apoio e incentivo científico. Amo vocês meninas!!!

À **CAPES** pelo apoio financeiro, sem o qual a realização desse trabalho seria impossível.

A **Universidade Federal do Piauí** pela possibilidade de concretização de mais um desafio.

Minha família, por me fornecer o suporte necessário para seguir nessa jornada. À minha **Mãe** por estar sempre ao meu lado, mesmo quando não concordava com as minhas decisões e por me transmitir a grande maioria dos valores que tenho. Ao meu **Pai** por sempre acreditar em mim. Ao meu irmão **Álber**, pela amizade. Aos meus **Avós**, em especial às

minhas avós **Ana Maria** e **Ezeuda** por deixarem a minha vida tão mais doce. Aos meus tios **Marcelo, Fábio, João, Ulisses, Regina e Patrícia** e primas **Beatriz** e **Flávia** pelo apoio e carinho.

Cada um de vocês contribuiu de alguma forma para a conclusão desse trabalho e, conseqüentemente, para a pessoa que me tornei ao longo da realização dele. **A todos, o meu muito obrigada!!!**

“A mente que se abre a uma nova idéia jamais voltará ao seu tamanho original.”

Albert Einstein

Delineamento e caracterização de lipossomas contendo nimodipina para uso direcionado a doenças neurodegenerativas. MORENO, L.C.G.A.I, Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Dissertação de Mestrado. NTF/CCS/UFPI (2011).

## **RESUMO**

A nimodipina é um bloqueador seletivo dos canais de cálcio tipo L pertencente ao grupo das diidropiridinas. Apresenta uma lipofilicidade elevada e por isso, atravessa facilmente a barreira hematoencefálica atingindo o sistema nervoso central (SNC). Devido a essa facilidade de chegar ao cérebro, o referido vasodilatador é utilizado no tratamento de espasmos cerebrovasculares, derrames, enxaquecas, no aumento da capacidade cognitiva de portadores da doença de Alzheimer, no auxílio à recuperação de pacientes com traumatismo craniano, além de apresentar aplicabilidade na terapia de transtornos do humor e mostrar propriedades anticonvulsivantes. Contudo, a administração oral da nimodipina é limitada por sua baixa solubilidade aquosa e alto metabolismo de primeira passagem hepático, o que resulta em uma biodisponibilidade diminuída. Esse problema pode ser solucionado pela utilização de carreadores farmacêuticos de escala nanométrica. Desta forma, produzimos uma formulação lipossomal contendo nimodipina e observamos seus efeitos sobre o SNC. No primeiro estudo houve a produção e caracterização das preparações lipossomais (LCNa e LCNb) para posteriormente proceder-se a avaliação dos efeitos da administração intraperitoneal aguda da formulação que apresentou os melhores resultados (LCNa) sobre parâmetros bioquímicos e hematológicos em camundongos *Swiss* machos. O tratamento não causou nenhuma morte ou toxicidade nos animais. No segundo estudo foram investigados os efeitos da administração de LCNa em três modelos animais de ansiedade: teste do campo aberto, do claro e escuro e do labirinto em cruz elevado. Os resultados obtidos sugerem que a formulação possivelmente exerce um efeito ansiolítico em camundongos sem ocasionar sedação ou relaxamento muscular. O terceiro estudo visa investigar o efeito da administração de LCNa em dois modelos animais de depressão: teste de suspensão pela cauda e teste do nado forçado. A diminuição no tempo de imobilidade dos animais tratados com a formulação em ambos os testes sugere um possível efeito antidepressivo de LCNa. O quarto estudo visa investigar o efeito da aplicação de LCNa em convulsões induzidas por pilocarpina. Os resultados mostram que a administração da formulação 30 minutos antes da administração de pilocarpina impediu as crises convulsivas e o estado de mal epiléptico, sugerindo que LCNa apresentou atividade anticonvulsivante nesse modelo de convulsão.

**Palavras-chave:** efeito ansiolítico, efeito antidepressivo, efeito anticonvulsivante, lipossomas, nimodipina.

Design and characterization of liposomes containing nimodipine for use targeted to neurodegenerative diseases. MORENO, L.C.G.A.I, Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Dissertação de Mestrado. NTF/CCS/UFPI (2011).

## **ABSTRACT**

The nimodipine is a selective blocker of L-type calcium channels belonging to the group of dihydropyridines. It features a high lipophilicity and therefore readily crosses the blood brain barrier reaching the central nervous system (CNS). Due to this facility from reaching the brain, this is a vasodilator used in the treatment of cerebrovascular spasm, stroke, migraines, increased cognitive ability of Alzheimer's disease, aid in the recovery of patients with head trauma, and presents applicability in the treatment of mood disorders and show anticonvulsant properties. However, oral administration of nimodipine is limited by its low aqueous solubility and high first pass liver metabolism, which results in decreased bioavailability. This problem can be solved by the use of nanometer-scale pharmaceutical carriers. Thus, we produce a liposomal formulation containing the nimodipine and observe its effects on the CNS. In the first study we performed the production and characterization of liposomal preparations (LCNa and LCNb) to later proceed to evaluate the effects of acute intraperitoneal administration of the formulation that presented the best results (LCNa) on biochemical and hematological parameters in male Swiss mice. The treatment caused no deaths or toxicity in animals. In the second study we investigated the effects of administration of LCNa in three animal models of anxiety: open-field test, light and dark and elevated plus maze. The results obtained suggest that the formulation possibly exerts an anxiolytic effect in mice without causing sedation or muscle relaxation. The third study aimed to investigate the effect of LCNa administration in two animal models of depression: the tail suspension test and forced swimming. The decrease in the immobility time of animals treated with the formulation in both tests suggests a possible effect of antidepressant LCNa. The fourth study aims to investigate the effect of LCNa seizures induced by pilocarpine. The results show that the administration of the formulation 30 minutes before administration of pilocarpine prevented seizures and status epilepticus, suggesting that LCNa showed anticonvulsant activity in this model of seizures.

**Keywords:** antidepressant, anticonvulsant, anxiolytic effect, liposome, nimodipine.

## LISTA DE FIGURAS

### Capítulo II

Figura 1: Efeito de LCNa nas doses de 0,1, 1 e 10 mg/kg no número de cruzamentos dos camundongos.....58

Figura 2: Efeito de LCNa nas doses de 0,1, 1 e 10 mg/kg no número de *rearings* dos camundongos.....59

Figura 3: Efeito de LCNa nas doses de 0,1, 1 e 10 mg/kg no número de *groomings* dos camundongos.....60

Figura 4: Efeito de LCNa nas doses de 0,1, 1 e 10 mg/kg no tempo de permanência no campo claro.....61

### Capítulo III

Figura 1: Efeito de LCN nas doses de 0,1, 1 e 10 mg/kg no tempo de imobilidade dos camundongos no teste da suspensão pela cauda .....72

## LISTA DE TABELAS

### Capítulo I

Tabela 1: Características das formulações lipossomais contendo nimodipina (LCNa e LCNb).....	40
Tabela 2: Características das formulações lipossomais contendo nimodipina (LCNa e LCNb) após os testes de estabilidade acelerada .....	41
Tabela 3: Características de LCNa após o teste de estabilidade em longo prazo .....	41
Tabela 4: Características de LCNb após os testes de estabilidade em longo prazo .....	42
Tabela 5: Parâmetros relativos ao "Screening Hipocrático", após administração por via intraperitoneal de LCNa nas doses de 0,1, 1 e 10 mg/kg .....	43
Tabela 6: Média de peso dos camundongos em gramas, após administração por via intraperitoneal de LCNa nas doses de 0,1, 1 e 10 mg/kg .....	44
Tabela 7: Parâmetros bioquímicos de camundongos <i>Swiss</i> tratados por via intraperitoneal de LCNa nas doses de 0,1, 1 e 10 mg/kg .....	45
Tabela 8: Parâmetros hematológicos de camundongos <i>Swis</i> , tratados por via intraperitoneal com LCNa nas doses de 0,1, 1 e 10 mg/kg .....	46

### Capítulo II

Tabela 1: Efeito de LCNa nas doses de 0,1, 1 e 10 mg/kg no número de entradas, porcentagem de entradas, tempo de permanência e porcentagem de tempo no braços abertos .....	62
-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

### Capítulo III

Tabela 1: Efeito de LCNa nas doses de 0,1,1 e 10 mg/kg no tempo de imobilidade de camundongos no teste do nado forçado .....	75
------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

## Capítulo IV

Tabela 1: Efeito agudo de LCNa em parâmetros comportamentais de camundongos adultos no modelo de convulsão induzida por pilocarpina .....	88
-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de Variância
ALP	Fostase alcalina
ALT	Alanina aminotransferase
AST	Aspartato aminotransferase
CC	Crises convulsivas
CEEA	Comitê de Ética em Experimentação com Animais
CHCM	Concentração de hemoglobina corpuscular média
EDTA	Etilenodiamino-tetracético-dissódico
EME	Estado de mal epiléptico
HB	Anticoagulante da Laborlab <sup>®</sup>
HCM	Hemoglobina corpuscular médio
i.p.	Via intraperitoneal
LAPNEX	Laboratório de Pesquisa Neuroquímica Experimental
LIKA	Laboratório de Imuno Patologia Keizo-Assami
LCN	Lipossomas contendo nimodipina
LCNa	Lipossomas neutros contendo nimodipina
LCNb	Lipossomas carregados positivamente contendo nimodipina
LIEME	Latência para instalação do mal epiléptico
LIPC	Latência para instalação da primeira convulsão
ME	Movimentos estereotipados
NTF	Núcleo de Tecnologia Farmacêutica
PDI	Índice de polidispersão
PZ	Potencial Zeta (carga de superfície)
s	Segundo
SCP	Sinais colinérgicos periféricos
SNC	Sistema nervoso central

T	Tremores
TP	Tamanho de partícula
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
UFPI	Universidade Federal de Piauí
VCM	Volume corpuscular médio

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	18
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	21
2.1 Ansiedade.....	21
2.2 Depressão.....	22
2.3 Convulsão .....	23
2.4 Aplicação de antagonistas dos canais de cálcio na terapia de doenças do SNC.....	24
2.5 Nimodipina .....	26
2.6 Lipossomas .....	27
2.7 Lipossomas contendo nimodipina (LCN).....	28
3 OBJETIVOS .....	30
3.1 Objetivo Geral.....	30
3.2 Objetivos Específicos .....	30
4 CAPÍTULO I: Desenvolvimento, caracterização e estudos da toxicidade aguda da formulação lipossomal contendo nimodipina (LCN).....	31
5 CAPÍTULO II: Estudos da atividade ansiolítica de uma formulação lipossomal contendo nimodipina (LCNa) .....	51
6 CAPÍTULO III: Estudos da atividade antidepressiva de uma formulação lipossomal contendo nimodipina (LCNa).....	67
7 CAPÍTULO IV: Estudos da atividade anticonvulsivante de uma formulação lipossomal contendo nimodipina (LCNa).....	82
8 Conclusões.....	94
9 Referências.....	95
10 Apêndices.....	100

## 1 INTRODUÇÃO

A busca do ser humano por substâncias que curem suas moléstias é um processo que vem de milhares de anos. A princípio, preparados de base vegetal tinham a sua eficácia estabelecida por experimentações empíricas que eram passadas através das gerações. Observando a aplicação de determinadas plantas na terapia de patologias tornou-se possível a obtenção de inúmeros fármacos como os opióides extraídos da *Papaver somniferum*, o ácido salicílico extraído da casca do caule de árvores de *Salix alba* e a quinina extraída da *Cinchona ledgeriana*. No entanto, a indústria farmacêutica propriamente dita só surgiu no século XIX com o desenvolvimento da química orgânica na Europa, em especial na Alemanha. Na época, a pesquisa de tinturas e pigmentos forneceu uma excelente fonte de compostos com potencial farmacêutico (HURKO, 2010).

A produção de fármacos sintéticos permitiu a construção de moléculas, em seus diversos níveis de complexidade, possibilitando o desenvolvimento de terapias para uma série de doenças que permaneciam sem tratamento. Assim, o desenvolvimento da química fina ampliou consideravelmente o arsenal terapêutico disponível. No entanto, a procura por novas moléculas com atividade farmacológica continua. Isso ocorre porque algumas patologias permanecem sem cura conhecida e outras são tratadas com medicamentos que apresentam baixa eficiência e alta toxicidade, fazendo-se necessário o desenvolvimento de compostos mais eficazes e que apresentem menos efeitos colaterais. Como exemplo de doenças que ainda são tratadas com medicamentos pouco eficientes e que apresentam várias reações adversas pode-se citar as patologias do sistema nervoso central (SNC).

Dados da Organização Mundial de Saúde indicam que mais de 450 milhões de pessoas são acometidas por algum tipo de desordem que envolva o SNC. Dentre as alterações observadas, a ocorrência dos estados de ansiedade e depressão, as chamadas doenças do mundo moderno, vem se mostrando crescentes. Esse fato é alarmante, uma vez que os referidos distúrbios comportamentais diminuem consideravelmente a qualidade de vida do indivíduo afetado e podem ser incapacitantes (SILVA *et al*, 2007).

Outra patologia de prevalência mundial é a epilepsia, uma disfunção crônica do SNC que afeta mais de 50 milhões de pessoas em todo o mundo. Devido à sua grande incidência, vários estudos vêm sendo conduzidos no sentido do

desenvolvimento de terapias mais efetivas. Todavia, apesar dos avanços realizados, essa doença ainda constitui um importante problema de saúde pública, uma vez que aproximadamente um terço dos pacientes é refratário aos esquemas terapêuticos atualmente adotados (BHUTADA *et al*, 2010).

Uma alternativa viável para melhorar as opções de tratamento dos distúrbios do SNC é a utilização de nanossistemas com a finalidade de promoção da liberação controlada do fármaco. Os carreadores de escala nanométrica apresentam a propriedade de aumentar a biodisponibilidade e reduzir a toxicidade das moléculas, melhorando a cinética, potencializando o efeito e diminuindo as reações adversas dos medicamentos (PIMENTEL *et al*, 2007).

Nesse contexto, a inserção de princípios ativos em lipossomas constitui uma boa opção para aprimorar as terapias existentes. Lipossomas são vesículas aquosas circundadas por bicamadas concêntricas de fosfolípidos. Apresentam grande flexibilidade estrutural, podendo haver alterações nas suas características (tamanho, composição lipídica, carga de superfície, número e fluidez da bicamada de fosfolípidos) de acordo com as necessidades farmacológicas. Além disso, esses nanossistemas podem encapsular tanto compostos hidrofílicos (no interior do compartimento aquoso), quanto hidrofóbicos (na bicamada lipídica), possibilitando a vetorização e a proteção do fármaco (BATISTA; DE CARVALHO; SANTOS-MAGALHÃES, 2007; MACHADO; GNOATTO; KLÜPPEL, 2004).

Estudos mostraram que moléculas encapsuladas em lipossomas podem ser centenas de vezes mais eficazes que suas formas não-encapsuladas, já que esses nanossistemas aumentam a biodisponibilidade do agente terapêutico (RIBEIRO; MOURA; PIMENTEL, 2008). O uso de carreadores nanométricos como sistemas de liberação controlada também promove uma diminuição nos efeitos colaterais da terapia, aumentando a qualidade de vida do paciente. Além disso, os altos custos envolvidos nas técnicas de produção dos lipossomas podem ser compensados por um menor tempo de tratamento, o que implica em menores quantidades de princípios ativos usados, menor período de internação e menos procedimentos realizados (FREZÁRD *et al*, 2000). Assim, o uso da nanotecnologia pode proporcionar uma redução nos custos da terapia.

Com base nisso, o objetivo desse trabalho foi desenvolver e caracterizar uma formulação lipossomal contendo o antagonista dos canais de cálcio nimodipina,

além de testar os seus efeitos em modelos experimentais de patologias do SNC, em especial na ansiedade, depressão e convulsão.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Ansiedade

A ansiedade é um estado emocional, com componentes psicológicos e fisiológicos, naturalmente encontrado na existência humana. É caracterizada por uma sensação de desconforto, acompanhada por sintomas físicos (mal-estar gástrico, dor precordial, palpitações, sudorese excessiva e cefaléia) que podem variar de um indivíduo para outro. Está presente em situações de mudança e possibilita uma postura de maior atenção a um perigo eminente. É considerada uma emoção que nos protege do desconhecido (NARDI, 1998).

A ansiedade pode passar de uma ocorrência normal para um quadro patológico quando é desproporcional a circunstância que a causa ou quando não existe um motivo aparente para a sua instalação. Nesse momento, o que seria uma reação normal do organismo a uma experiência nova, baseada no instinto de preservação, passa a se tornar uma doença (ANDRADE; GORENSTEIN, 1998). A forma patológica contribui significativamente para o surgimento de outros transtornos no paciente e se apresenta de diferentes modos, no entanto é provável que todos eles sejam ocasionados pelos mesmos circuitos neurológicos (HAN *et al*, 2009).

Esse distúrbio é considerado uma das condições psiquiátricas mais comuns, afetando de 10 a 30% da população. É debilitante e reduz significativamente a qualidade de vida do indivíduo afetado (SEO *et al*, 2007). O tratamento farmacológico da ansiedade consiste no uso dos ansiolíticos benzodiazepínicos, buspirona e medicamentos antidepressivos. Apesar dos fármacos mostrarem grande eficácia, a sua administração tem alguns inconvenientes provocados por uma vasta gama de efeitos colaterais. Os mais comuns são: amnésia, indução de dependência e sedação (RAUPP *et al*, 2008).

Além dos medicamentos supracitados, outras formas de terapia vêm sendo testadas no controle da ansiedade. Um modo alternativo de combater os sintomas ansiosos baseia-se na administração de drogas anti-histamínicas no paciente, em especial a hidroxizina, um antagonista dos receptores H<sub>1</sub>. Também existem vários relatos sobre a aplicação de antipsicóticos em baixas doses no tratamento ambulatorial da patologia. Os resultados da administração desses medicamentos nesses casos apontam para um efeito ansiolítico, embora as reações adversas

relacionadas ao seu uso (discinesia tardia) restrinjam seu emprego. A utilização de fitoterápicos no tratamento da ansiedade também vem sendo extensamente estudada. Entre eles, os que apresentaram melhores efeitos foram o *Piper methysticum*, a *Valeriana officinallis* e a *Passiflora edulis* (ANDREATINI; BOERNGEN-LACERDA; FILHO ZOERTTO, 2001).

Diante do exposto pode-se afirmar que a descoberta de novos compostos com atividade contra a ansiedade e menos reações adversas faz-se necessária.

## 2.2 Depressão

Os sentimentos de alegria e tristeza são de ocorrência natural na existência humana. A tristeza é uma resposta esperada em situações de perda, derrota, desapontamento e outras adversidades, que tem valor adaptativo, do ponto de vista evolucionário, uma vez que nos leva a permanecer em retraimento e assim economizar energia e recursos para empreitadas futuras e ao mesmo tempo serve de alerta para as pessoas do nosso convívio de que estamos precisando de ajuda e atenção. No entanto, quando a tristeza ultrapassa o limiar da normalidade observamos o desenvolvimento de uma patologia denominada depressão (DEL PORTO, 1999).

A depressão é um distúrbio mental com alto grau de sofrimento psíquico. Sabe-se que a doença envolve inúmeros aspectos clínicos, etiopatogênicos e de terapia e que, se não tratada precocemente e de forma adequada, pode levar à incapacitação do paciente ou até mesmo à morte por suicídio. Além da tristeza sem motivo aparente, sintoma mais comum na patologia, outros sinais observados são: irritabilidade, desânimo, retraimento social, baixa auto-estima, humor disfórico, tendência autodepreciativa, alteração do sono e do apetite, ideação paranóide e pensamento recorrente de suicídio. As causas da doença ainda não foram bem elucidadas, mas acredita-se que elas possam envolver uma predisposição genética e influencias do meio, como morte de um parente ou perda do emprego (STELLA, 2002).

A referida patologia é caracterizada por prejuízos físicos e sociais, com episódios de longa duração, de caráter crônico, com taxas elevadas de recaídas e altos índices de suicídio. Estima-se que a cada ano surjam aproximadamente 2

milhões de novos casos, e só no Brasil são mais de 10 milhões de ocorrências (COUTINHO *et al*, 2003).

O tratamento da depressão é realizado principalmente utilizando os antidepressivos tricíclicos (amitriptilina, clomipramida, imipramina, maprotilina e nortriptilina), inibidores seletivos da recaptação de serotonina (citalopram, fluoxetina, fluvoxamina, paroxetina e sertralina) e inibidores da enzima monoaminaoxidase (moclobemida e tranilcipromina). Outros fármacos usados na terapia da doença são a mianserina (antidepressivo da classe dos tetracíclicos indicado para pessoas sensíveis aos efeitos colaterais de outros antidepressivos), a mirtazapina (antidepressivo tetracíclico que difere dos demais por agir aumentando diretamente a quantidade de serotonina e noradrenalina), a nefazodona (age antagonizando e inibindo a recaptação da serotonina) e a venlafaxina (antidepressivo que apresenta efeito sobre as aminas 5-hidroxitriptamina e noradrenalina) Esses medicamentos produzem, em média, uma melhora dos sintomas depressivos de 60 a 70%, enquanto a taxa de placebo é em torno de 30% (SOUZA, 1999).

Com a doença em foco, o desenvolvimento de novas terapias mais eficazes e que apresentem menos reações adversas torna-se alvo de inúmeras pesquisas.

### **2.3 Convulsão**

Convulsões são alterações no funcionamento do SNC caracterizadas por crises recorrentes originadas por descargas excessivas dos neurônios cerebrais que ocorrem pela quebra de equilíbrio entre os mecanismos de neurotransmissão inibitórios e excitatórios, resultando em mudanças persistentes do funcionamento cerebral normal e do estado cognitivo (ZOUHAR *et al*, 1989). Podem apresentar manifestações motoras, sensitivas, sensoriais, psíquicas ou neurodegenerativas. São classificadas como tônicas (contrações mantidas durante algum tempo), clônicas (contrações intermitentes, quando os músculos são contraídos e relaxados de forma alternada) ou tônico-clônicas (LOSCHER, 1998).

Podem ser divididas em parciais, quando tem início em um pequeno grupo de neurônios que constituem o foco da convulsão, e generalizadas, quando envolvem os dois hemisférios cerebrais desde o princípio. Os sintomas das crises convulsivas parciais dependem da localização da sua origem no cérebro. Essas crises podem ser do tipo parcial simples, quando não há alteração da consciência, ou parcial complexa,

quando há alteração da consciência. As crises generalizadas podem consistir apenas de movimentos motores ou de uma rápida perda do tônus muscular. A forma mais comum de convulsão generalizada é a tônico-clônica, conhecida como grande mal (MELDRUM; AKBAR; CHAPMAN, 1999).

Aproximadamente 50 milhões de pessoas apresentam crises convulsivas em todo o mundo e, apesar do distúrbio responder ao tratamento em cerca de 70% dos casos, apenas três quartos dos afetados recebem a terapia adequada em países em desenvolvimento (ADEYEMI *et al*, 2010).

O tratamento inicial da convulsão é realizado utilizando-se medicamentos que irão suprimir as crises. Os fármacos administrados atuam na estabilização das membranas celulares (reduzindo o fluxo exagerado de íons), aumentando a concentração de neurotransmissores inibitórios ou diminuindo a ação de neurotransmissores excitatórios. Os compostos aplicados na terapia da patologia são: fenobarbital, fenitoína, carbamazepina, benzodiazepínicos, oxcarbazepina, topiramato, gabapentina, lamotrigina e ácido valpróico (valproato). Contudo, as terapias apresentam algumas reações adversas como sonolência, lentificação na realização de tarefas e desconcentração, o que faz com que alguns pacientes abandonem total ou parcialmente o tratamento (FONTINELLE, 2001). Desta forma, evidencia-se que a busca por novos compostos com atividade anticonvulsivante e menos efeitos colaterais é de vital importância para o desenvolvimento de um tratamento mais adequado para a patologia.

#### **2.4 Aplicações de antagonistas dos canais de cálcio na terapia de doenças do SNC**

Estudos mostraram que durante algumas fases de patologias do SNC o fluxo sanguíneo cerebral está diminuído enquanto o consumo de oxigênio está aumentado. Isso causa um considerável prejuízo no estado do paciente, uma vez que a necessidade de nutrientes no cérebro é maior que a disponibilidade encontrada. Desta forma, evidencia-se que o tratamento da isquemia cerebral pode proporcionar uma melhora efetiva no quadro clínico das doenças que afetam o SNC (ASLAN *et al*, 2010).

Os íons cálcio entram nas células através dos canais do tipo L, N e T presentes nas membranas. Elevações nas concentrações de cálcio intracelular

ocasionam o aumento das contrações das células da vasculatura e do músculo cardíaco. Assim, a entrada desse íon nas células dos vasos sanguíneos cerebrais provoca uma vasoconstrição, o que reduz o fluxo sanguíneo no órgão. Além disso, a penetração excessiva de cálcio nos neurônios acarreta um processo denominado excitotoxicidade que causa danos neuronais e morte celular por necrose ou apoptose (GUYTON; HALL 2002).

Alguns fármacos atuam se ligando aos canais de cálcio, particularmente nos tecidos excitáveis, impedindo a entrada do íon na célula por inibição competitiva. Cada canal tem várias subunidades diferentes, e cada classe de fármacos atua em um deles. O bloqueio de grande parte dos canais presentes em determinada célula provoca a redução da sua excitabilidade e contratibilidade, uma vez que é o influxo de cálcio que ativa as proteínas contrativas e outros canais (BERNE; LEVY, 2004). Desta forma, os bloqueadores dos canais de cálcio atuam na promoção de vasodilatação, além de impedir a entrada excessiva desse íon nas células nervosas e, conseqüentemente, impedir a morte celular por excitotoxicidade.

Alguns desses medicamentos mais comumente utilizados pertencem ao grupo das diidropiridinas. Essas moléculas mostram atuação exclusiva nos canais tipo L e, devido a uma elevada lipofilicidade, atravessam com facilidade a barreira hematoencefálica concentrando-se no cérebro e promovendo uma vasodilatação mais pronunciada nesse órgão (SILVA, 2006).

Sabe-se que o aumento de cálcio intracelular também apresenta um importante papel na atividade epileptiforme e que, por isso, antagonistas dos canais de cálcio constituem um alvo para o desenvolvimento de formulações antiepilépticas e neuroprotetoras. Nesse contexto a nimodipina, um bloqueador dos canais de cálcio pertencente ao grupo das diidropiridinas, mostrou atividade anticonvulsivante e neuroprotetora em modelos de convulsão induzidos por pilocarpina e lítio-pilocarpina (MIKATI *et al.*, 2004).

Estudos mostraram uma elevação das concentrações de cálcio nas plaquetas e linfócitos de pacientes depressivos e bipolares, o que sugere que o aumento das concentrações intracelulares desse íon pode participar da fisiopatologia dos transtornos afetivos. Esse achado foi fortalecido pela descoberta de que alguns antidepressivos tricíclicos provocam um bloqueio nos canais de cálcio, indicando que

o referido mecanismo pode contribuir para os seus efeitos terapêuticos (GRUNZE *et al.*, 1996). O bloqueador dos canais de cálcio nimodipina mostrou efeito antidepressivo em ensaios realizados em animais, o que subsidia a hipótese de que o aumento do influxo desse íon pode atuar no processo de instalação e desenvolvimento de transtornos afetivos e que o bloqueio dos canais que permitem a entrada de cálcio nas células pode ser usado no tratamento dessas patologias (KATAGIRI *et al.*, 2001).

Além da atuação na reperfusão cerebral e na terapia da convulsão e dos transtornos afetivos, os bloqueadores dos canais de cálcio também são utilizados no tratamento de demências e doenças degenerativas relacionadas à idade. Nesse sentido, pesquisas realizadas com a nimodipina mostraram que o fármaco provoca uma melhora na memória de ratos idosos ou com lesões cerebrais, acelera a aquisição de aprendizagem associativa em coelhos envelhecidos e inibe a diminuição no número de sinapses no hipocampo de células granulares relacionada à idade (KABUTO *et al.*, 1995), dados que demonstram uma possível aplicabilidade da nimodipina na terapia de patologias como o Mal de Alzheimer.

## 2.5 Nimodipina

A nimodipina ou 2,6-dimetil-4-(3-nitofenil)-1,4-di-hidropiridina-3-5-dicarboxilato de 2-metoxietilo e de 1-metileno é um bloqueador dos canais de cálcio que apresenta fórmula molecular  $C^{21}H^{26}N^2O^7$  e peso molecular de 418,4. Apresenta-se na forma de pó cristalino com coloração variando entre amarelo e amarelo claro, é praticamente insolúvel em água, facilmente solúvel em acetato de etila e ligeiramente solúvel em etanol, apresenta polimorfismo e é fotossensível (FARMACOPÉIA PORTUGUESA, 2005).

O referido fármaco inibe a entrada dos íons de cálcio na célula, diminuindo as contrações da musculatura vascular. Estudos mostram que a nimodipina produz uma vasodilatação acentuada nas artérias cerebrais (ASLAN *et al.*, 2009). Esse efeito é provocado por sua elevada lipofilicidade, característica que permite uma rápida passagem da molécula pela barreira hematoencefálica.

A nimodipina normalmente é administrada via oral na dose de 60 mg de 4 em 4 horas. É rapidamente absorvida, com um pico de concentração plasmática em

torno de 1 hora após sua administração. A meia-vida de eliminação é de 8 a 9 horas. Apresenta taxa de ligação com proteínas plasmáticas de 95%. A eliminação é renal (1%) e biliar/fecal (99%). A biodisponibilidade oral é baixa (13%), devido aos altos índices de metabolismo de primeira passagem hepático. O medicamento é indicado em casos de hemorragia subaracnóidea associada à deficiência neurológica e contra-indicado em casos de hipotensão grave. Suas reações adversas são divididas em reações ocasionais (cefaléia, tontura ou obnubilação, náuseas, reações alérgicas, diarreia e edema nos membros inferiores) e reações raras (sensação de calor, insuficiência cardíaca congestiva, hipotensão, taquicardia e trombocitopenia). Apresenta risco quando administrada durante a gravidez (possível efeito teratogênico ou tóxico para o embrião) (ZANINI; OGA, 1995).

A administração da nimodipina apresenta alguns empecilhos, constituídos principalmente por seu metabolismo de primeira passagem hepático elevado, que resulta em biodisponibilidade diminuída, baixa solubilidade aquosa e fotossensibilidade. Essas dificuldades podem ser resolvidas pela produção de uma formulação lipossomal contendo nimodipina. Os lipossomas promovem a liberação controlada do fármaco, o que gera um aumento da biodisponibilidade e uma redução da toxicidade da molécula, além de proteger a nimodipina da degradação pela luz.

## 2.6 Lipossomas

Lipossomas são estruturas compostas por uma ou mais bicamadas concêntricas de fosfolipídeos organizadas em torno de um compartimento aquoso interno. Podem desempenhar a função de carreadores de fármacos, biomoléculas ou agentes de diagnóstico. Formulações lipossomais têm mostrado a capacidade de melhorar a farmacocinética e farmacodinâmica das moléculas encapsuladas, uma vez que essas formulações podem induzir a rápida absorção e retenção do fármaco no tecido-alvo (CAVALCANTI *et al*, 2011).

Esses nanocarreadores constituem um método alternativo para a solubilização de compostos que tenham alta toxicidade, sejam fotossensíveis ou não apresentam solubilidade para a administração na forma livre. Eles têm mostrado bons resultados na encapsulação de fármacos insolúveis, fotossensíveis e citotóxicos (SANTOS, 2005). Dessa forma, compostos hidrossolúveis podem ser veiculados no compartimento aquoso e compostos lipossolúveis podem ser carreados na bicamada lipídica. Além disso, as vesículas lipídicas não possibilitam somente a vetorização e

proteção do medicamento, permitindo também o direcionamento dos compostos para sítio específicos de células ou órgãos, propriedade denominada sítio-especificidade (PIMENTEL *et al*, 2007).

Esses nanossistemas, também conhecidos como vesículas lipídicas, podem ser classificados em vesículas grandes e pequenas. Assim temos os lipossomas multilamelares (Multilamellar Vesicles: MLV) que são formados por várias bicamadas concêntricas intercaladas por compartimentos aquosos, lipossomas pequenos unilamelares (Small Unilamellar Vesicles: SUV) que são os menores lipossomas possíveis de serem obtidos, constituídos por uma única bicamada como membrana e um pequeno compartimento aquoso e finalmente os lipossomas grandes unilamelares (Larger Unilamellar Vesicles: LUV) que são constituídos por uma bicamada com grande cavidade aquosa (LIMA, 1995).

## **2.7 Lipossomas contendo nimodipina (LCN)**

Nimodipina é um bloqueador dos canais de cálcio do grupo das diidropiridinas utilizado no tratamento de espasmos cerebrais, derrames, enxaquecas, na terapia de pacientes com doença de Alzheimer, além de apresentar propriedades antidepressivas e anticonvulsivantes. Todavia, sua aplicação terapêutica é limitada por seu alto metabolismo de primeira passagem hepático que resulta em baixa biodisponibilidade quando a molécula é administrada por via oral. A administração endovenosa de nimodipina poderia ser uma alternativa para melhorar sua biodisponibilidade no entanto, como a molécula apresenta baixíssima solubilidade em água (2,3 µg/mL) ela deve ser solubilizada em etanol e a injeção do álcool provoca irritação nos vasos sanguíneos (YU; HE; TANG, 2006). Soma-se a isso o fato de que a cinética da nimodipina mostra-se desfavorável. Como apresenta meia-vida de eliminação curta, a molécula permanece pouco tempo na circulação, impedindo a manutenção de quantidades adequadas do fármaco no plasma para uma terapia de sucesso (WANG *et al*, 2006).

Esses problemas podem ser solucionados com a utilização de carreadores de escala nanométrica. O uso da nanotecnologia possibilita a proteção do medicamento contra a degradação extracelular, melhora a seletividade em relação ao alvo, reduz a frequência de administração e a duração do tratamento e melhora o perfil

farmacocinético e de solubilidade da molécula (SANTOS-MAGALHÃES, 2010). Além disso, a liberação controlada do fármaco aumenta a sua biodisponibilidade e diminui a sua toxicidade, dessa forma o paciente utiliza doses menores e sofre com menos efeitos colaterais.

Lipossomas têm mostrado bons resultados na encapsulação de fármacos insolúveis, fotossensíveis e citotóxicos. Nesse contexto, a encapsulação da nimodipina em lipossomas pode aumentar a biodisponibilidade da molécula, diminuindo consideravelmente a quantidade de fármaco necessária para a obtenção do efeito desejado, além de solucionar os problemas de solubilidade e fotossensibilidade da molécula. Alguns pesquisadores encapsularam o fármaco em lipossomas e microesferas, todavia o efeito das formulações obtidas não foi estudado (WANG et al, 2006; YU; HE; TANG, 2006). Com essa finalidade foi produzida uma formulação lipossomal contendo nimodipina (LCN) e seus efeitos sobre o sistema nervoso central foram observados.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo Geral**

- Desenvolver uma preparação lipossomal contendo nimodipina, bem como avaliar a sua toxicidade e atividade farmacológica sobre o sistema nervoso central de camundongos.

### **Objetivos Específicos**

- Produzir uma formulação que contenha lipossomas unilamelares pequenos (SUV), com tamanho, homogeneidade e carga de superfície adequados para a realização de testes *in vivo*, além de alto teor de fármaco e alta taxa de encapsulação;
- Avaliar a toxicidade aguda da formulação lipossomal contendo nimodipina em camundongos;
- Investigar a ação farmacológica de lipossomas contendo nimodipina em modelos experimentais de ansiedade, depressão e convulsão.

**Desenvolvimento, caracterização e estudos da toxicidade aguda da formulação lipossomal contendo nimodipina**

**<sup>1</sup>MORENO, LCGAI; <sup>2</sup>CAVALCANTI, IMF; <sup>2</sup>SANTOS-MAGALHÃES, NS;  
<sup>1</sup>FREITAS, RM; <sup>1</sup>SANTOS, HMLR**

<sup>1</sup>Laboratório de Pesquisa em Neuroquímica Experimental do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Piauí. Campus Ministro Petrônio Portela, 64.049-550, Teresina – PI, Brasil.

<sup>2</sup>Laboratório de Imunopatologia Keizo-Asami da Universidade Federal de Pernambuco. Av. Prof. Moraes Rego, s/n, Cidade Universitária, 50670-901, Recife-PE, Brasil.

## RESUMO

A nimodipina é um bloqueador dos canais de cálcio pertencente ao grupo das diidropiridinas que, por apresentar elevada lipofilicidade, atravessa facilmente a barreira hematoencefálica chegando ao Sistema Nervoso Central (SNC). Devido a essa facilidade em atingir o cérebro, o referido fármaco é usado no tratamento de inúmeras patologias que afetam o SNC. No entanto, a administração oral da nimodipina é limitada pela baixa solubilidade aquosa da molécula e alto metabolismo de primeira passagem, o que resulta em uma biodisponibilidade diminuída. Uma alternativa para transpor esta limitação seria a encapsulação da nimodipina em lipossomas. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi preparar, caracterizar e estudar a toxicidade aguda de uma preparação lipossomal convencional contendo nimodipina. As formulações (LCNa e LCNb) foram produzidos utilizando o método da hidratação do filme lipídico. Posteriormente, avaliou-se a toxicidade aguda da formulação que apresentou melhores resultados (LCNa) nos parâmetros bioquímicos e hematológicos de camundongos, além de se promover a observação de possíveis alterações da administração na massa corpórea, no consumo de água e ração e na produção de excretas dos animais. Os lipossomas neutros contendo nimodipina (LCNa) apresentaram tamanho de partícula de  $107,17 \pm 1,53$ nm, índice de polidispersão  $0,303 \pm 0,002$ , potencial zeta  $-5,32 \pm 1,29$  mV, pH 7,4, teor de fármaco de  $100 \pm 0,21\%$  e taxa de encapsulação do  $100 \pm 0,21\%$ . Enquanto que, os lipossomas carregados positivamente contendo nimodipina (LCNb) apresentaram tamanho de partícula de  $113,13 \pm 1,07$  nm, índice de polidispersão  $0,299 \pm 0,004$ , potencial zeta  $+10,17 \pm 1,99$  mV, pH 7,4,  $79,17 \pm 0,79\%$  e taxa de encapsulação de  $73,68 \pm 0,92\%$ . Os exames bioquímicos e hematológicos dos camundongos tratados com LCNa não mostraram alterações significativas quando comparados ao grupo controle. Além disso, não houve alteração no consumo de água e ração e na produção de excretas dos camundongos tratados com a formulação, nem perda de peso. Os resultados indicam que ambas as formulações lipossomais contendo nimodipina (LCNa e LCNb) são adequadas para a realização de testes *in vivo* e apresentaram alto teor e taxa de encapsulação, todavia LCNa apresentou melhores resultados. A administração intraperitoneal da formulação escolhida para os testes com animais (LCNa) nas doses de 0,1, 1 e 10 mg/kg em camundongos Swiss mostrou-se segura.

**Palavras-chave:** lipossomas, nimodipina, sistema nervoso central, toxicidade aguda.

## ABSTRACT

The nimodipine is a calcium channel blocker belonging to the group of dihydropyridines that, due to its high lipophilicity, easily crosses the blood brain barrier reaching the central nervous system (CNS). Due to this facility to reach the brain, this drug is used to treat many diseases that affect the CNS. However, oral administration of nimodipine is limited by the low aqueous solubility of the molecule and high first pass metabolism, resulting in decreased bioavailability. An alternative to bridge this limitation would be the encapsulation of nimodipine in liposomes. In this context, the objective of this work was to prepare, characterize and to study the toxicity of a preparation containing conventional liposomal nimodipine. The formulations (LCNa and LCNb) were produced using the method of hydration of the lipid film. Subsequently, we evaluated the acute toxicity of the formulation with better results (LCNa) in biochemical and hematological parameters of mice, and to promote the observation of possible changes in body weight management, water consumption and food production and excreta of animals. The neutral liposomes containing nimodipine (LCNa) had particle size of  $107.17 \pm 1.53$  nm, polydispersity index of  $0.303 \pm 0.002$ , zeta potential  $-5.32 \pm 1.29$  mV, pH 7.4, drug content of  $100 \pm 0.21\%$  and the encapsulation rate of  $100 \pm 0.21\%$ . While the positively charged liposomes containing nimodipine (LCNb) had particle size of  $113.13 \pm 1.07$  nm, polydispersity index of  $0.299 \pm 0.004$ , zeta potential  $+10.17 \pm 1.99$  mV, pH 7.4,  $79.17 \pm 0.79\%$  and encapsulation rate of  $73.68 \pm 0.92\%$ . The biochemical and hematological LCNa of treated mice showed no significant changes when compared to controls. In addition, no change in water consumption and the production of feed and excreta of mice treated with the formulation or weight loss. The results indicate that both liposomal formulations containing nimodipine (LCNa and LCNb) are suitable for testing in vivo and had a high content and encapsulation rate, however LCNa yielded better results. The intraperitoneal administration of the formulation chosen for the test animals (LCNa) at doses of 0.1, 1 and 10 mg / kg in Swiss mice proved to be safe.

**Keywords:** central nervous system, liposomes, nimodipine, toxicity.

## INTRODUÇÃO

A nimodipina é um bloqueador dos canais de cálcio pertencente ao grupo das diidropiridinas que, por apresentar elevada lipofilicidade, atravessa facilmente a barreira hematoencefálica chegando ao cérebro. Devido a essa facilidade em atingir o sítio de ação, esse vasodilatador é utilizado no tratamento de espasmos cerebrovasculares, derrames, enxaquecas, no aumento da capacidade cognitiva de portadores da doença de Alzheimer (WANG *et al*, 2006), no auxílio à recuperação de pacientes com traumatismo craniano (ASLAN *et al*, 2009), além de apresentar propriedades antidepressivas e anticonvulsivantes (PAZZAGLIA *et al*, 1995; FRYE *et al*, 2003).

A administração oral da nimodipina é limitada pela baixa solubilidade aquosa da molécula (2,30 µg/mL) e alto metabolismo de primeira passagem, o que resulta em uma biodisponibilidade diminuída. Por chegar em quantidades reduzidas na circulação, este medicamento deve ser aplicado em doses elevadas e isso provoca inúmeros efeitos colaterais. Uma alternativa à administração oral seria a aplicação endovenosa de nimodipina, no entanto como o fármaco não é solúvel em água, ele deveria ser solubilizado em etanol e injeções do álcool provocam irritações nos vasos sanguíneos, inviabilizando a técnica (YU; HE; TANG, 2006).

Outra opção para transpor esta limitação seria a encapsulação da nimodipina em lipossomas. Lipossomas são vesículas aquosas limitadas por uma ou mais bicamada de fosfolídeos. Funcionam como carreadores de fármacos, biomoléculas e agentes diagnósticos e apresentam a capacidade de melhorar a farmacocinética e a farmacodinâmica das moléculas encapsuladas (CAVALCANTI *et al*, 2011). Os referidos sistemas apresentam grande flexibilidade estrutural, podendo haver mudanças em algumas de suas propriedades físico-químicas (tamanho, composição lipídica, carga de superfície, número e fluidez da bicamada de lipídeos) de acordo com a necessidade farmacológica (PIMENTEL *et al*, 2007).

Esses nanossistemas, também conhecidos como vesículas lipídicas, podem conter uma única bicamada lipídica ou bicamadas múltiplas em torno do compartimento aquoso interno, sendo classificadas como unilamelar e multilamelar, respectivamente. Em relação ao tamanho, as vesículas unilamelares podem ser pequenas ou grandes, assim são observados lipossomas unilamelares pequenos - SUV (*small unilamellar*

*vesicles*) e lipossomas unilamelares grandes - LUV (*large unilamellar vesicles*) (BATISTA, 2007).

Os carreadores de escala nanométrica têm mostrado bons resultados na encapsulação de fármacos insolúveis, fotossensíveis e citotóxicos. Nos lipossomas, compostos hidrossolúveis podem ser veiculados no compartimento aquoso e compostos lipossolúveis podem ser carreados na bicamada lipídica. Além disso, os nanossistemas possibilitam também o direcionamento dos medicamentos para sítios específicos de células ou órgãos, propriedade denominada sítio-especificidade (MACHADO, 2007).

No presente trabalho, a nimodipina foi encapsulada em lipossomas convencionais, os quais foram caracterizados quanto as suas propriedades, estabilidade e eficácia da encapsulação do fármaco. No entanto, para que a sua aplicabilidade terapêutica seja aceita foi necessário que se realizasse uma investigação da sua segurança por meio de estudos de toxicidade. Com esse intuito, foram avaliados os efeitos da administração aguda da formulação que apresentou as melhores características (LCNa) nos parâmetros bioquímicos e hematológicos de camundongos, bem como foi determinado se houveram alterações na massa corporal, no consumo de água e ração e na produção de excretas.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Preparação dos lipossomas contendo nimodipina (LCNa e LCNb)**

Os lipossomas contendo nimodipina foram preparados usando o método da hidratação do filme lipídico (ANDRADE *et al*, 2004). Inicialmente foram produzidos os lipossomas sem carga (LCNa), utilizando os lipídeos fosfatidilcolina de soja e colesterol (proporção de 8:2) e 0,010 g de nimodipina para a obtenção de uma formulação lipossomal com concentração lipídicas de 117,6 mM e concentração do fármaco de 1,0 mg/mL. Esses constituintes foram solubilizados em uma mistura de clorofórmio:metanol (3:1 v/v), sob agitação magnética. Os solventes foram removidos por evaporação a vácuo, utilizando o rotaevaporador por 60 min ( $37 \pm 1$  ° C, 80 rpm), resultando em um filme lipídico. Este filme foi, então, hidratado com 10 mL de solução tampão fosfato pH 7,4 produzindo assim vesículas multilamelares grandes. A suspensão lipossomal foi então submetida à sonicação por sonda ultrassônica (Vibra Cell, BRANSON, EUA) a 200 W e 40 Hz para 300 s para a obtenção de lipossomas unilamelares pequenos. Os lipossomas com carga (LCNb) foram preparados como

descrito acima, sendo na fase orgânica adicionada a estearilamina (lípeo catiônico) a fim de conferir carga positiva à formulação. A preparação lipossomal carregada positivamente continha, então fosfatidilcolina: colesterol: estearilamina (7:2:1).

### **Caracterização das formulações**

Após sua produção, as formulações lipossomais contendo nimodipina (LCNa e LCNb) foram caracterizadas. Os parâmetros avaliados foram: aspecto macroscópico, pH, tamanho das partículas (TP), índice de polidispersão (PDI) e potencial zeta (PZ). O pH dos lipossomas foi aferido utilizando um medidor de pH digital (bioblock Científico 99.622, Prolabo, Paris, França) a temperatura ambiente. O tamanho de partículas e índice de polidispersão dos lipossomas foi determinado através da espectroscopia de correlação de fótons (analisador de partícula Beckman Coulter Delsa™ Nano S). Nesta análise 300µL da suspensão lipossomal foi diluída em 1 mL de água ultra-pura. O potencial zeta dos lipossomas, que corresponde à carga de superfície das vesículas, foi determinado diluindo 50 µL da suspensão lipossomal em 5 mL de água ultra-pura e lendo a solução resultante em aparelho Zetatrak NC-148 (Microtrac).

### **Avaliação da estabilidade acelerada e em longo prazo das formulações**

Os testes de estabilidade acelerada avaliam as condições de estresse a que as formulações são submetidas quando da sua fabricação, transporte e armazenamento. Após 24h da preparação, as formulações lipossomais foram centrifugadas a 6000 rpm, 4 °C por 1 hora para simular a passagem acelerada do tempo, assim como foram submetidas a agitação mecânica por 48 horas a  $37 \pm 1$  °C, para simular condições de transporte (LIRA *et al*, 2009).

Para monitoramento das formulações ao longo do tempo, a estabilidade em longo prazo foi iniciada logo após as formulações (LCNa e LCNb) serem preparadas e o ao longo dos dias. Os parâmetros avaliados foram: aspecto macroscópico, a variação do pH, tamanho das partículas e índice de polidispersão (PDI) (LIRA *et al*, 2009).

### **Determinação do teor da nimodipina nos lipossomas**

Primeiramente foi construída curva de calibração com concentrações de 0,5; 1; 2; 3; 4; 5 e 6 µg/mL de nimodipina com o solvente metanol. Posteriormente, uma alíquota de amostra lipossomal (30 µL) foi diluída em metanol para uma concentração final teórica de 3 µg/mL de nimodipina. Essa solução foi lida em espectrofotômetro UV

à 237 nm. As amostras foram analisadas para determinação do teor da nimodipina a 237 nm usando uma curva padrão de nimodipina com concentrações variando de 0,5 a 6 mg/mL (LIRA *et al*, 2009).

### **Eficiência de encapsulação**

A eficiência de encapsulação da nimodipina foi determinada pela técnica de ultrafiltração/ultracentrifugação usando unidades Ultrafree® (Millipore, EUA). Uma alíquota de amostra lipossomal (400 µL) foi transferida para unidades filtrantes (Millipore®) com poros de 0,22 µm de diâmetro e submetida à ultracentrifugação em 10000 rpm por 1h. A quantidade de nimodipina encapsulada foi obtida por diferença entre a quantidade total dosada na formulação e aquele obtido no filtrado após centrifugação. As leituras foram realizadas por espectrofotometria UV no  $\lambda = 237$  nm (LIRA *et al*, 2009).

### **Estudos de toxicidade aguda de LCNa**

#### **Animais**

Foram utilizados camundongos *Swiss* machos com 2 meses de idade e com peso de 25 a 30 g, provenientes do Biotério Central do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Piauí. Os animais destinados ao experimento permaneceram nas dependências do Laboratório de Pesquisa em Neuroquímica Experimental, por sete dias, para a adequada aclimação. As unidades experimentais receberam água e dieta (Labina®) *ad libitum* e foram mantidos sob condições controladas de iluminação (ciclo 12 h claro/escuro) e temperatura ( $25 \pm 2$  °C). Os protocolos experimentais e procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal do Piauí (CEEA/UFPI N° 014/11).

#### **Tratamento dos animais**

Quatro grupos de 16 camundongos cada foram tratados via intraperitoneal com solução salina 0,9% (grupo controle) e LCN nas doses de 0,1, 1 e 10 mg/kg (LCN 0,1, LCN 1 e LCN 10 respectivamente). Metade dos animais de cada grupo (n=8) foi observada durante 24 horas para posteriormente se proceder a coleta de sangue. A outra metade (n=8) ficou sob observação por um período de 30 dias para visualização e registro de possíveis sinais de toxicidade da formulação. Durante esses 30 dias, o

consumo de água e ração foi registrado diariamente, a massa corporal dos camundongos foi medida a cada dois dias durante o período de observação e os animais foram avaliados quanto a sinais clínicos de toxicidade.

### **Screening Hipocrático**

Nas 24 horas após o tratamento procedeu-se a observação dos camundongos no tempo de 30 minutos, 1, 2, 4, 8, 12 e 24 h durante um dia de observação, com o objetivo de quantificar-se os efeitos de LCN sobre os parâmetros: a) Estado de consciência e disposição (aparência geral, frêmito vocal e irritabilidade); b) Coordenação motora (atividade geral, resposta ao toque, resposta ao aperto de cauda, contorção abdominal, marcha e reflexo de endireitamento); c) Tônus muscular (tônus das patas, tônus do corpo, força para agarrar e ataxia); d) Reflexos (auricular e corneal); e) Atividade do sistema nervoso central (tremores, convulsões, estimulações, fenômeno de “*Straub*”, sedação, hipnose e anestesia); f) Atividade do sistema nervoso autônomo (lacrimação, ptosis, micção, defecação, piloereção, hipotermia e respiração).

### **Coleta de sangue para determinação dos parâmetros bioquímicos e hematológicos**

Ao final das 24 horas do período de observação, os animais foram anestesiados via intraperitoneal com pentobarbital sódico na dose de 40 mg/kg e se procedeu a coleta de sangue por rompimento do plexo retro-orbital com auxílio de capilar de vidro (WAYNFORTH, 1980). O sangue foi acondicionado em dois tipos de tubo: um com anticoagulante HB (Laborlab<sup>®</sup>) para determinação dos parâmetros hematológicos, e o outro, sem anticoagulante, para obtenção do soro para avaliação dos parâmetros bioquímicos.

### **Determinações dos parâmetros bioquímicos**

Para análise bioquímica, o material foi centrifugado a 3500 rpm durante 10 minutos e, em seguida, determinados os níveis de glicose, uréia, creatinina, ácido úrico, aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT) colesterol total, triglicerídeos, fosfatase alcalina (ALP), proteínas totais, bilirrubinas total e direta. Os ensaios foram realizados em aparelho automático Labmax 240 (Labtest) com sistemas comerciais da Labtest<sup>®</sup>.

## **Determinações dos parâmetros hematológicos**

Os valores para eritrócitos, leucócitos, plaquetas, hemoglobina, hematócrito e os índices hematimétricos, volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) foram determinados imediatamente após a coleta por meio do analisador automático de células hematológicas Advia 120/Hematology Siemens. A contagem diferencial de leucócitos foi realizada em extensões coradas com May-Grünwald-Giemsa. Em cada ensaio, 100 células foram analisadas e contadas.

## **Análises estatísticas**

Os valores foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (E.P.M.) dos dados. As diferenças entre os grupos foram determinadas através da Análise de Variância (ANOVA), seguida, quando detectada diferença, pelo teste t-Student-Newman-Keuls com post hoc teste. O nível de significância para rejeição da hipótese de nulidade foi sempre  $\geq$  a 5 %.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Pesquisas recentes evidenciaram que a descoberta e o desenvolvimento de novas moléculas com efeito terapêutico não é suficiente para assegurar um progresso na terapia medicamentosa, uma vez que muitos dos compostos recém-desenvolvidos apresentam limitações que diminuem a sua eficiência e aumentam a sua toxicidade. Uma estratégia promissora envolve o desenvolvimento de sistemas de liberação controlada de fármacos. Assim, sistemas coloidais, com tamanho variando entre 10 e 1000 nm, incluindo emulsões, micro e nanopartículas, micro e nanocápsulas e lipossomas são amplamente utilizados como sistemas terapêuticos (LAOUINIA *et al*, 2011).

Nesse contexto, os lipossomas apresentam inúmeras aplicações biológicas, farmacêuticas e industriais, uma vez servem de veículo para regular a administração de medicamentos, material genético, proteínas e outras moléculas. Tais aplicações, conhecidas como sistemas de entrega de fármacos exigem que esses nanossistemas apresentem tamanho e homogeneidade adequados para atingir seus alvos (YAMASHITA *et al*, 2010).

As formulações lipossomais contendo nimodipina (LCNa e LCNb) exibiram efeito Tyndall, característico de partículas em escala nanométrica. Os resultados indicam que os lipossomas são do tipo unilamelares pequenos (SUV), com tamanho (TP), homogeneidade (PDI) e carga de superfície (PZ) compatível com aplicações em testes *in vivo*, além de alto rendimento e elevado teor de fármaco encapsulado. A formulação neutra (LCNa) mostrou maior teor ( $100 \pm 0,21\%$ ) e taxa de encapsulação ( $100 \pm 0,45\%$ ) que a formulação de carga positiva (LCNb) com teor de  $79,17 \pm 0,79\%$  e taxa de encapsulação de  $73,68 \pm 0,92\%$  (Tabela 1). Esses dados sugerem que provavelmente tenha ocorrido uma reação para induzir a forma protonada de nimodipina e assim, o fármaco tenha adquirido carga positiva quando em solução, o que gerou uma interação eletrostática que diminui a eficiência de encapsulação (WANG *et al*, 2006).

**Tabela 1:** Características das formulações lipossomais contendo nimodipina (LCNa e LCNb).

	LCNa	LCNb
<b>TP</b>	$107,17 \pm 1,53$ nm	$113,13 \pm 1,07$ nm
<b>PDI</b>	0,303	0,299
<b>PZ</b>	$-5,32 \pm 1,29$ mV	$+10,17 \pm 1,99$ mV
<b>pH</b>	7,4	7,4
<b>Teor de Fármaco</b>	$100 \pm 0,21\%$	$79,17 \pm 0,79\%$
<b>Taxa de Encapsulação</b>	$100 \pm 0,45\%$	$73,68 \pm 0,92\%$

TP: tamanho de partícula, PDI: índice de polidispersão, PZ: potencial Zeta (carga de superfície).

As formulações lipossomais (LCNa e LCNb) resistiram aos testes de estabilidade acelerada (centrifugação e estresse mecânico), mantendo suas características micro e macroscópicas iniciais, como, por exemplo, tamanho de partícula e índice de polidispersibilidade (Tabela 2)

**Tabela 2:** Características das formulações lipossomais contendo nimodipina (LCNa e LCNb) após os testes de estabilidade acelerada.

	Centrifugação	Agitação mecânica
<b>LCNa</b>		
TP	125,47 ± 5,65 nm	145,37 ± 6,65 nm
PDI	0,333	0,298
pH	7,4	7,3
Aspecto macroscópico	Sem precipitado	Sem precipitado
<b>LCNb</b>		
TP	128,37 ± 2,76 nm	109,03 ± 11,72 nm
PDI	0,304	0,558
pH	8,0	7,4
Aspecto macroscópico	Sem precipitado	Sem precipitado

TP: tamanho de partícula, PDI: índice de polidispersão, PZ: potencial Zeta (carga de superfície), LCNa: formulação lipossomal neutra contendo nimodipina, LCNb: formulação lipossomal carregada positivamente contendo nimodipina.

Os testes de estabilidade em longo prazo realizados com LCNa mostraram que a formulação na forma de dispersão se manteve estável por um período de 15 dias, isto é, não apresentou mudanças no seu aspecto macro e microscópico, assim como variação brusca de pH nesse intervalo de tempo. Após esse prazo, observou-se que a formulação não estava mais homogênea e que ela apresentava precipitados indicativos da formação de cristais de nimodipina. Além disso, observou-se mudanças no pH, no tamanho de partícula e índice de polidispersão de LCN, sugerindo que a formulação havia tornado-se instável (Tabela 3).

**Tabela 3:** Características de LCNa após os teste de estabilidade a longo prazo

Tempo (dias)	Aspectos macroscópicos e microscópicos	pH	TP (nm)	PDI
0	SUV (ausência de cristal nimodipina)	7,4	107,17 ± 1,53 nm	0,303 ± 0,02
7	SUV (ausência de cristal de nimodipina)	7,4	112,15 ± 3,44 nm	0,368 ± 0,05
15	SUV (ausência de cristal de nimodipina)	7,4	115,12 ± 6,36 nm	0,345 ± 0,08
21	SUV (presença de cristal de nimodipina)	7,8	154,67 ± 7,4 nm	0,516 ± 0,098

TP: tamanho de partícula, PDI: índice de polidispersão, SUV: lipossomas unilamelares pequenos.

Já os testes de estabilidade em longo prazo realizados com LCNb indicaram que a formulação se manteve estável por um período menor (7 dias). Após esse período de tempo, observou-se a presença de precipitados indicando a formação de cristais de nimodipina. Também houve mudanças no pH, tamanho de partícula e índice de polidispersão de LCNb, indicando que a formulação havia perdido a estabilidade (tabela 4).

Os problemas com a estabilidade de LCNa e LCNb foram solucionados com a liofilização das formulações, que passaram a ser armazenadas na forma de pó e ressuspenso com tampão fosfato pH 7,4 somente no momento da sua administração.

**Tabela 4:** Características de LCNb após os testes de estabilidade em longo prazo

Tempo (dias)	Aspectos macroscópicos e microscópicos	pH	TP (nm)	PDI
0	SUV (ausência de cristal nimodipina)	7,4	113,13 ± 1,07 nm	0,299 ± 0,004
7	SUV (ausência de cristal de nimodipina)	7,4	116,35 ± 2,88 nm	0,320 ± 0,009
15	SUV (presença de cristal de nimodipina)	7,8	167,45 ± 6,36 nm	0,675 ± 0,067
21	SUV (presença de cristal de nimodipina)	8,2	178,67 ± 7,4 nm	0,578 ± 0,086

TP: tamanho de partícula, PDI: índice de polidispersão, SUV: lipossomas unilamelares pequenos.

A administração intraperitoneal de LCNa não alterou de forma significativa o estado de consciência, a disposição, o sistema motor e muscular dos animais (Tabela 5). Durante o período de observação de 30 dias após o tratamento, não foram visualizados sinais clínicos de toxicidade como: atividade diminuída, anorexia, perda de peso, tontura, hiperventilação, síncope, salivação e convulsão (MUKINDA; SYCE, 2007).

Nenhuma morte foi registrada. Não houve alteração no consumo de água e ração e na produção de excretas dos camundongos tratados com LCNa quando comparados ao grupo controle.

**Tabela 5: Parâmetros relativos ao “Screening Hipocrático”, após administração por via intraperitoneal de LCNa nas doses de 0,1, 1 e 10 mg/kg.**

Parâmetros Avaliados	Grupos	Horas								N
		0	1/2	1	2	4	8	12	24	
<b>Estado de Consciência e Disposição</b> <b>Atividade geral</b>	Controle	4	4	4	4	4	4	4	4	16
	LCNa 0,1 mg/kg	3	3	3	4	4	4	4	4	16
	LCNa 1 mg/kg	3	3	3	3	4	4	4	4	16
	LCNa 10 mg/kg	3	2	3	2	4	4	4	4	16
<b>Sistema Motor e Muscular</b> <b>Resposta ao toque</b>	Controle	4	4	4	4	4	4	4	4	16
	LCNa 0,1 mg/kg	3	3	3	4	4	4	4	4	16
	LCNa 1 mg/kg	3	3	3	4	4	4	4	4	16
	LCNa 10 mg/kg	2	2	3	4	4	4	4	4	16
<b>Reflexo de endireitamento</b>	Controle	4	4	4	4	4	4	4	4	16
	LCNa 0,1 mg/kg	3	3	3	4	4	4	4	4	16
	LCNa 1 mg/kg	3	2	3	4	4	4	4	4	16
	LCNa 10 mg/kg	3	2	2	4	4	4	4	4	16
<b>Tônus do corpo</b>	Controle	4	4	4	4	4	4	4	4	16
	LCNa 0,1 mg/kg	3	3	3	4	4	4	4	4	16
	LCNa 1 mg/kg	2	3	3	4	4	4	4	4	16
	LCNa 10 mg/kg	3	2	4	4	4	4	4	4	16

“Score” numérico da tabela: 4: normal; 3: levemente reduzido; 2: moderadamente reduzido; 1: intensamente reduzido; 0: ausente. n - Número de animais por grupo.

Sabe-se que a diminuição da massa corpórea dos animais é um parâmetro simples e sensível de toxicidade após a exposição a agentes toxicantes, além de ser um sinal de fácil detecção (THANABHORN *et al*, 2006). Não houve alteração no peso dos camundongos tratados com LCNa (Tabela 2), a exceção de um animal do grupo LCNa 1 que apresentou perda de peso no final da segunda semana. A diminuição de 5 gramas na massa corpórea foi revertida ao final da terceira semana, o que indica que ela não foi representativa de toxicidade. A manutenção do peso dos camundongos após a administração da formulação é um indicativo da segurança de LCNa.

**Tabela 6: Média de Peso dos camundongos em gramas**, após administração por via intraperitoneal de LCNa nas doses de 0,1, 1 e 10 mg/kg.

Grupos Tratamentos	Dias após o tratamento (Peso médio dos animais)				
	0	7	15	21	30
Controle	29,38 ± 0,62 g	29,38 ± 0,62 g	29,38 ± 0,62 g	29,38 ± 0,62 g	29,38 ± 0,62 g
LCNa 0,1	30,0 ± 0 g	30,0 ± 0 g	30,0 ± 0 g	30,0 ± 0 g	30,0 ± 0 g
LCNa 1	30,0 ± 0 g	30,0 ± 0 g	29,38 ± 0,62 g	30,0 ± 0 g	30,0 ± 0 g
LCNa 10	29,38 ± 0,62 g	29,38 ± 0,62 g	29,38 ± 0,62 g	29,38 ± 0,62 g	29,38 ± 0,62 g

Peso dos camundongos machos *Swiss*, tratados por via intraperitoneal com solução salina 0,9% (grupo controle, n=8) e com LCN nas doses de 0,1 mg/kg (LCN 0,1, n=8), 1 mg/kg (LCN 1, n=8), e 10 mg/kg (LCN 10, n=8). Os animais foram observados durante 30 dias após o tratamento. Os valores representam à média ± E.P.M. do número de animais usados nos experimentos. n – representa o número de animais em cada grupo.

O tratamento agudo com LCNa nas doses de 0,1, 1 e 10 mg/kg não ocasionou alterações significativas no resultado dos exames bioquímicos realizados nos animais (Tabela 3). Todos os parâmetros mantiveram-se dentro da faixa de referência para camundongos (BRITO, 1994), o que mais uma vez sugere que a administração intraperitoneal de LCNa é segura para camundongos.

Tabela 7: **Parâmetros bioquímicos obtidos do soro de camundongos *Swiss*, tratados por via intraperitoneal com LCNa nas doses de 0,1, 1 e 10 mg/kg.**

<b>Parâmetros Bioquímicos</b>	<b>Controle</b>	<b>LCN 0,1 mg/kg</b>	<b>LCN 1 mg/kg</b>	<b>LCN 10 mg/kg</b>
	<b>(n=8)</b>	<b>(n=8)</b>	<b>(n=8)</b>	<b>(n=8)</b>
Glicose (mg/dL)	93,44 ± 1,63	93,22 ± 1,62	93,89 ± 1,42	93,56 ± 1,41
Uréia (mg/dL)	50,99 ± 1,45	51,56 ± 1,71	51,67 ± 1,96	51,78 ± 2,17
Creatinina (mg/dL)	0,36 ± 0,01	0,37 ± 0,01	0,38 ± 0,01	0,37 ± 0,01
Ácido úrico (mg/dL)	2,61 ± 0,04	2,60 ± 0,05	2,47 ± 0,06	2,54 ± 0,06
Triglicerídeos (mg/dL)	105,6 ± 0,57	105,6 ± 1,69	106,6 ± 2,16	106,9 ± 1,93
CT (mg/dL)	86,07 ± 0,57	86,53 ± 0,26	86,59 ± 0,22	86,46 ± 0,21
Proteínas totais (mg/dL)	6,64 ± 0,03	6,36 ± 0,08	6,52 ± 0,06	6,70 ± 0,13
AST (U/mL)	91,67 ± 1,92	89,33 ± 3,44	90,56 ± 2,48	91,38 ± 4,14
ALT (U/mL)	53,25 ± 1,70	52,50 ± 2,91	53,63 ± 2,71	53,88 ± 3,21
Fosfatase alcalina (U/I)	157,4 ± 1,22	158,1 ± 9,5	157,8 ± 6,50	157,1 ± 8,92
Bilirrubina total (mg/dL)	0,16 ± 0,03	0,15 ± 0,04	0,16 ± 0,04	0,16 ± 0,03
Bilirrubina direta (mg/dL)	0,13 ± 0,02	0,12 ± 0,01	0,13 ± 0,01	0,13 ± 0,02

Parâmetros bioquímicos obtidos do soro de camundongos machos *Swiss*, tratados por via intraperitoneal com solução salina 0,9% (grupo controle, n=8) e com LCN nas doses de 0,1 mg/kg (LCN 0,1, n=8), 1 mg/kg (LCN 1, n=8), e 10 mg/kg (LCN 10, n=8). Os animais foram observados durante 24 horas após o tratamento. Os valores representam à média ± E.P.M. do número de animais usados nos experimentos. n – representa o número de animais em cada grupo.

O estado de atividade da medula óssea e os efeitos intravascular de LCNa foram monitorados através de exame hematológico. O tratamento agudo com a formulação nas doses de 0,1, 1 e 10 mg/kg não ocasionou alterações significativas no resultado dos exames hematológicos realizados nos animais (Tabela 4), a exceção de um pequeno aumento no número de neutrófilos dos camundongos tratados com LCNa na dose de 0,1 mg/kg e uma elevação discreta dos valores percentuais referentes à quantidade de eosinófilos dos animais tratados com LCNa na dose de 10 mg/kg.

Denomina-se neutrofilia o aumento de neutrófilos no sangue, considerando os limites de referência. Sabe-se que descargas adrenérgicas mobilizam a liberação dessas células na corrente sanguínea. A manipulação dos camundongos durante o processo da

coleta pode causar liberação de adrenalina na corrente sanguínea do animal, o que pode ter ocasionado uma emissão de neutrófilos no sangue periférico, provocando neutrofilia. Além disso, o aumento do número de neutrófilos é um indicador sensível e específico da ocorrência de infecções bacterianas e que a aplicação intraperitoneal de LCNa 24 horas antes da coleta pode causar uma pequena lesão no peritônio do animal que pode servir de porta de entrada para bactérias que naturalmente colonizam a pele dos camundongos. Deste modo, a neutrofilia pode ser decorrente de uma resposta imune dos camundongos a uma infecção bacteriana discreta (FAILACE, 2003).

A ocorrência de eosinófilos normalmente se restringe à mucosa intestinal e o sua presença no sangue é modesta. A eosinofilia (aumento das referidas células no sangue) pode está relacionada a ocorrência de parasitoses nas unidades experimentais, uma vez que os eosinófilos participam da resposta de defesa aos parasitas intestinais, ou a reações alérgicas (HENRY, 2008). Como os animais utilizados são de procedência conhecida, o mais provável é que algum dos camundongos do grupo LCNa 10 tenha apresentado uma reação anafilática a um dos lipídeos usados na preparação da formulação lipossomal, à nimodipina ou ao pentobarbital sódico usado na anestesia antes da coleta.

Tabela 8: **Parâmetros hematológicos obtidos de camundongos Swiss**, tratados por via intraperitoneal com LCNa nas doses de 0,1, 1 e 10 mg/kg.

Parâmetros hematológicos	Controle (n=8)	LCN 0,1 mg/kg (n=8)	LCN 1 mg/kg (n=8)	LCN 10 mg/kg (n=8)
Hemácias (mm <sup>3</sup> )	8,0 ± 0,24	8,30 ± 0,42	8,250 ± 0,97	8,19 ± 0,96
Hemoglobina (g/dL)	14,0 ± 0,15	14,38 ± 0,99	14,63 ± 0,84	14,50 ± 0,63
Hematócrito (%)	43,33 ± 0,73	43,25 ± 0,84	43,75 ± 1,28	43,88 ± 1,27
VCM (fL)	49,22 ± 0,46	49,76 ± 0,53	49,50 ± 0,62	49,78 ± 0,57
HCM (pg)	15,56 ± 0,34	15,74 ± 0,38	15,63 ± 0,33	15,67 ± 0,71
CHCM (g/dL)	34,22 ± 0,62	34,59 ± 0,40	34,23 ± 0,48	34,76 ± 0,45
RDW (%)	14,11 ± 0,26	14,76 ± 0,35	14,48 ± 0,56	14,22 ± 0,39
Plaquetas (mm <sup>3</sup> )	292,4 ± 16,44	292,8 ± 20,34	293,2 ± 19,12	292,2 ± 18,34
Leucócitos totais (mm <sup>3</sup> )	7,33 ± 0,80	7,23 ± 0,45	7,48 ± 0,36	7,56 ± 0,48
Neutrófilos (%)	18,66 ± 0,04	20,00 ± 0,65 <sup>a</sup>	18,70 ± 0,30	18,80 ± 0,25
Eosinófilos (%)	0,36 ± 0,03	0,37 ± 0,02	0,36 ± 0,01	0,40 ± 0,15 <sup>a</sup>
Linfócitos (%)	78,12 ± 0,313	78,36 ± 0,66	78,25 ± 0,59	78,38 ± 0,82
Monócitos (%)	2,4 ± 0,03	2,4 ± 0,04	2,4 ± 0,06	2,4 ± 0,03

Parâmetros hematológicos obtidos de camundongos machos Swiss, tratados por via intraperitoneal com solução salina 0,9% (grupo controle, n=8) e com LCN nas doses de 0,1 mg/kg (LCN 0,1, n=8), 1 mg/kg (LCN 1, n=8), e 10 mg/kg (LCN 10, n=8). Os animais foram observados durante 24 horas após o tratamento. Os valores representam a média ± E.P.M. do número de animais usados nos experimentos. n – representa o número de animais em cada grupo. <sup>a</sup>p<0,05, quando comparados ao grupo controle (ANOVA e teste t-Student–Newman–Keuls como *post hoc test*);

## CONCLUSÕES

As formulações lipossomais derivadas de nimodipina (LCNa e LCNb) produzidas usando o método da hidratação de filme lipídico são adequadas para a realização de testes *in vivo* e apresentaram alto teor e taxa de encapsulação.

Os resultados demonstraram que é possível a encapsulação de nimodipina em lipossomas convencionais preparados a partir de fosfatidilcolina, colesterol e estearilamina (7:2:1) obtendo taxa de encapsulação de 100% e as formulações apresentaram estabilidade por tempo mais prolongado quando liofilizadas.

Conclui-se que a administração aguda de LCNa nas doses de 0,1, 1 e 10 mg/kg não produz efeitos tóxicos em camundongos, uma vez que não foram observados alterações nos parâmetros bioquímicos e hematológicos estudados. A administração da formulação também não alterou o peso dos animais e nem o seu consumo de água e ração e produção de excretas. Além disso, durante o período de observação não foram visualizados sinais clínicos de toxicidade. Os resultados indicam que a utilização de LCNa nas doses testadas é segura.

## REFERÊNCIAS

ANDRADE, C.A.S; CORREIA, M.T.S.; COELHO, L.C.B.B.; NASCIMENTO, S.C.; SANTOS-MAGALHÃES, N.S. Antitumor activity of *Cratylia mollis* lectin encapsulated into liposomes. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 278, p. 435–445, 2004.

ASLAN A., GURELIK M., CEMEK M., GOKSEL H. M., BUYUKOKUROGLU, M. E. Nimodipine can improve cerebral metabolism and outcome in patients with severe head trauma. **Pharmacological Research**, v. 59, p. 120–124, 2009.

BATISTA, C.M.; DE CARVALHO, S.M.B.; SANTOS-MAGALHÃES, N.S. Lipossomas e suas aplicações terapêuticas: Estado da arte. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 43, p. 167-179, 2007.

BRITO A.S. **Manual de Ensaio Toxicológicos in vivo**. Ed. Unicamp, Campinas, 1994.

CAVALCANTI, I.M.F., MENDONÇA, E.A.M., LIRA, M;C.B., HONORATO, S.B., CAMARA, C.A., AMORIM, R.V.S., MENDES FILHO, J., RABELLO, M.M, HERNANDES, M.Z., AYALA, A.P., SANTOS-MAGALHÃES, N.S. The encapsulation of b-lapachone in 2-hydroxypropyl-b-cyclodextrin inclusion complex into liposomes: A physicochemical evaluation and molecular modeling approach. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, 2011. In press.

FAILACE, R. **Hemograma: manual de interpretação**. 4<sup>a</sup> Edição. Editora ArtMed, 2003.

FRYE, M.A.; PAZZAGLIA, P.J.; GEORGE, M.S.; LUCKENBAUGH, D.A.; VANDERHAM, E.; DAVIS, C.L.; RUBINOW, D.R.; POST, R.M. Low CSF Somatostatin Associated with Response to Nimodipine in Patients with Affective Illness. **Biological Psychiatry**, v. 53, p. 180-183, 2003.

HENRY, J.B. **Diagnósticos Clínicos e Tratamento por Métodos Laboratoriais**. 20<sup>a</sup> Edição. Editora Manole, 2008.

LAOUINIA, A.; JAAFAR-MAALEJA, C.; SFAR, S.; CHARCOSSETA, C.; FESSI, H. Liposome preparation using a hollow fiber membrane contactor—Application to spironolactone encapsulation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 415, p. 53-61, 2001.

LIRA, M.C.B.; Siqueira-Moura, M.P.; Rolim-Santos, H.M.L.; Galetti, F.C.S.; Simioni, A.R.; Santos, N.P.; Egito, E.S.T.; Silva, C.L.; Tedesco, A.C.; Santos-Magalhães, N.S. In vitro uptake and antimycobacterial activity of liposomal usnic acid formulation. **Journal of Liposome Research**, v. 19, p. 49-58, 2009.

MACHADO, L.C.; GNOATTO, S.A.; KLÜPPEL, M.L.W. Lipossomas aplicados em farmacologia: uma revisão da literatura. **Estudos de Biologia**, v.67, p. 215-224, 2007.

MUKINDA, J.T.; SYCE, J.A. Acute and chronic toxicity of the aqueous extract of *Artemisia afra* in rodents. **Journal of Ethnopharmacology**, v.112, p. 138-144, 2007.

PAZZAGLIA, P.J.; GEORGE, M.S.; POST, R.M.; RUBINOW, R.D.; DAVIS, C.L. Nimodipine increases CSF somatostatin in affectively ill patients. **Neuropsychopharmacology**, v. 13, p. 75-83, 1995.

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

THANABHORN, S.; JAIJOY, K.; THAMAREE, S.; INGKANINAN, K.; PANTHONG, A. Acute and subacute toxicity study of the ethanol extract from *Lonicera japonica* Thunb. **Journal of Ethnopharmacology**, v.107, p.370-373, 2006.

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

WAYNFORTH, BH. **Injection techniques**. *In: experimental and Surgical Techniques in the Rat*. London: Academic Press. 1980.

YAMASHITA, K.; NAGATA, M.P.B.; MIYAZAKI, M.; NAKAMURA, H.; MAEDA, H. Homogeneous and reproducible liposome preparation relying on reassembly in microchannel laminar flow. **Chemical Engineering Journal**, v.165, p. 324–327, 2010

YU J.; HE H.B.; TANG X. Formulation and evaluation of nimodipine-loaded lipid microspheres. **Jounal of Pharmacy and Parmacology**, v. 58, p. 1429-1435, 2006.

**Estudos da atividade ansiolítica de uma formulação lipossomal contendo  
nimodipina (LCNa)**

**<sup>1</sup>MORENO, LCGAI; <sup>1</sup>SANTOS, PS; <sup>2</sup>CAVALCANTI, IMF; <sup>2</sup>SANTOS-  
MAGALHÃES, NS; <sup>1</sup>FREITAS, RM; <sup>1</sup>SANTOS, HMLR**

<sup>1</sup>Laboratório de Pesquisa em Neuroquímica Experimental do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Piauí. Campus Ministro Petrônio Portela, 64.049-550, Teresina – PI, Brasil.

<sup>2</sup>Laboratório de Imunopatologia Keizo-Asami da Universidade Federal de Pernambuco. Av. Prof. Moraes Rego, s/n, Cidade Universitária, 50670-901, Recife-PE, Brasil.

## RESUMO

A ansiedade é um estado emocional naturalmente encontrado na existência humana, entretanto pode passar a constituir um quadro patológico quando ocorre de forma desproporcional ao evento que a causa ou quando não existe razão aparente para a sua instalação. A administração da nimodipina, um antagonista seletivo dos canais de cálcio do tipo L, tem sido amplamente investigada no tratamento de inúmeras disfunções cerebrais. Contudo, a administração oral da nimodipina é limitada por sua baixa solubilidade aquosa e alto metabolismo de primeira passagem hepático, o que resulta em uma biodisponibilidade diminuída. Esse problema pode ser solucionado pela utilização de carreadores farmacêuticos de escala nanométrica. Desta forma, foi produzida uma formulação lipossomal derivada de nimodipina e seus efeitos ansiolíticos foram testados em três modelos animais de ansiedade (teste do campo aberto, do claro e escuro e do labirinto em cruz elevado). Os modelos animais de ansiedade são aplicados para se promover a avaliação dos efeitos ansiolíticos ou ansiogênicos de compostos, assim como identificação dos seus mecanismos de ação e estudo da neurobiologia da doença. Os resultados dos testes indicam que a administração da formulação lipossomal contendo nimodipina não apresenta efeito sedativo ou relaxante muscular nos animais, uma vez que não reduziu o número de cruzamentos, bem como não alterou significativamente o número de *groomings* e *rearings*. O aumento de permanência dos grupos LCN no campo claro, assim como o aumento no número de entradas, porcentagem de entradas, tempo de permanência e porcentagem de tempo nos braços abertos dos animais tratados com LCN também sugerem uma possível diminuição nos níveis de ansiedade dos animais tratados com a formulação, confirmando os resultados observados no teste do campo aberto.

**Palavras-chave:** efeito ansiolítico, lipossomas, nimodipina.

## **ABSTRACT**

Anxiety is an emotional state naturally found in human existence, however it can also become a pathological picture when there is so disproportionate to the event that the cause or when there is no apparent reason for their installation. The administration of nimodipine, a selective antagonist of calcium channels in the L-type has been widely investigated in the treatment of many brain disorders. However, oral administration of nimodipine is limited by its low aqueous solubility and high first pass liver metabolism, which results in decreased bioavailability. This problem can be solved by the use of nanometer-scale pharmaceutical carriers. This has produced a derivative of nimodipine liposomal formulation and its anxiolytic effects were tested in three animal models of anxiety (open-field test, light and dark and elevated plus maze). Animal models of anxiety are applied to promote the evaluation of anxiolytic or anxiogenic compounds, as well as identification of their mechanisms of action and study of the neurobiology of disease. The test results indicate that administration of liposomal formulation containing nimodipine has no sedative or muscle relaxant in animals, since they did not reduce the number of crossings, and did not significantly alter the number of rearings and groomings. The increased persistence of LCN groups in bright field as well as the increase in the number of entries, percentage of entries, length of stay and percentage of time in the open arms of the animals treated with LCN also suggest a possible decrease in anxiety levels of the animals treated with the formulation, confirming the results observed in open-field test.

**Keywords:** anxiolytic effect, liposomes, nimodipina.

## INTRODUÇÃO

A ansiedade é um estado emocional que acompanha o processo existencial humano, uma vez que circunstâncias normais na vida das pessoas como: desenvolvimento de algum tipo de sofrimento físico e mental, assim como as mudanças no cotidiano, estão associadas ao seu aparecimento. É expressa organicamente por uma sensação de mal-estar psíquico, traduzido por perturbações somáticas a exemplo de distúrbios gástrico, disfunções cárdio-respiratórias, sudorese excessiva e cefaléia, além de um estado de hipercontração muscular (BARROS *et al*, 2003).

A ansiedade pode deixar de ser um acontecimento natural e passar a se estabelecer como patologia quando ocorre de forma desproporcional ao evento que a causa ou quando não existe razão aparente para a sua instalação (ANDRADE; GORENSTEIN, 1998). A forma patológica afeta de 10 a 30% da população e é debilitante, além de reduzir significativamente a qualidade de vida dos pacientes (SEO *et al*, 2007), o que evidencia que a busca de novos agentes terapêuticos com propriedades ansiolíticas se faz necessária.

Dentro dessas perspectivas, a aplicação da nimodipina, um antagonista seletivo dos canais de cálcio do tipo L, tem sido amplamente investigada no tratamento de inúmeras disfunções cerebrais. Estudos demonstraram que o fármaco apresenta a capacidade de aumentar o fluxo sanguíneo cerebral, sendo usada no tratamento da isquemia presente em inúmeras patologias que afetam o cérebro, além de ser útil na terapia de distúrbios do humor, do déficit cognitivo de paciente portadores da doença de Alzheimer e apresentar propriedades anticonvulsivantes (YANPALLEWAR *et al*, 2004).

Contudo, a administração oral da nimodipina é limitada por sua baixa solubilidade aquosa e alto metabolismo de primeira passagem hepático, o que resulta em uma biodisponibilidade diminuída (ZANINI; OGA 1995). Esse problema pode ser solucionado pela utilização de carreadores farmacêuticos de escala nanométrica. Estudos demonstraram que esses nanossistemas são ferramentas úteis para melhorar o perfil farmacocinético de medicamentos que, devido a uma solubilidade aquosa reduzida, baixa biodisponibilidade e alta toxicidade tiveram a sua aplicabilidade farmacêutica limitada (SANTOS-MAGALHÃES; MOSQUEIRA, 2010). Desta forma, foi produzida uma formulação lipossomal derivada de nimodipina e seus efeitos

ansiolíticos foram testados em três modelos animais de ansiedade (teste do campo aberto, do claro e escuro e do labirinto em cruz elevado).

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Produção da formulação lipossomal derivada de nimodipina (LCNa)**

Os lipossomas contendo nimodipina foram preparados usando o método da hidratação do filme lipídico (ANDRADE *et al*, 2004). Os lipossomas sem carga (LCNa) foram produzidos utilizando os lipídeos fosfatidilcolina de soja e colesterol (proporção de 8:2) e 0,010 g de nimodipina para a obtenção de uma formulação lipossomal com concentração lipídeos de 117,6 mM e concentração do fármaco de 1,0 mg/mL. Esses constituintes foram solubilizados em uma mistura de clorofórmio:metanol (3:1 v/v), sob agitação magnética. Os solventes foram removidos por evaporação a vácuo, utilizando o rotaevaporador por 60 min ( $37 \pm 1$  °C, 80 rpm), resultando em um filme lipídico. Este filme foi, então, hidratado com 10 mL de solução tampão fosfato pH 7,4 produzindo assim vesículas multilamelares grandes. A suspensão lipossomal foi então submetida à sonicação por sonda ultrassônica (Vibra Cell, BRANSON, EUA) a 200 W e 40 Hz para 300 s para a obtenção de lipossomas unilamelares pequenos.

### **Estudos da possível atividade ansiolítica de LCNa**

#### **Animais**

Foram utilizados camundongos *Swiss* machos com 2 meses de idade e com peso de 25 a 30 g, provenientes do Biotério Central do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Piauí. Os animais destinados ao experimento permaneceram nas dependências do Laboratório de Pesquisa em Neuroquímica Experimental, por sete dias, para a adequada aclimatação. As unidades experimentais receberam água e dieta (Labina<sup>®</sup>) *ad libitum* e foram mantidos sob condições controladas de iluminação (ciclo 12 h claro/escuro) e temperatura ( $25 \pm 1$  °C). Os protocolos experimentais e procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal do Piauí (CEEA / UFPI N° 014/11).

### Teste do campo aberto

Para este experimento os camundongos foram divididos em quatro grupos com oito animais cada e tratados via intraperitoneal com solução salina 0,9% (grupo controle), LCNa nas doses de 0,1, 1 e 10 mg/kg (grupos LCNa 0,1, 1 e 10 respectivamente) e com diazepam na dose de 2 mg/kg (controle positivo). A atividade motora dos animais foi verificada por meio de um campo aberto feito de acrílico (paredes transparentes e piso preto, 30 x 30 x 15 cm) e dividido em 9 quadrantes iguais, baseado no modelo descrito por ARCHER (1973). Após 30 minutos dos tratamentos, os animais, um por vez, foram colocados no centro do campo aberto sendo quantificado o número de cruzamentos com as quatro patas (atividade locomotora espontânea; ALE), número de comportamento de autolimpeza (*grooming*) e o número de levantamentos (*rearing*), sem encostar-se à parede, durante o tempo de 5 minutos.



Fonte: Arquivo Pessoal.

### Teste do claro e escuro

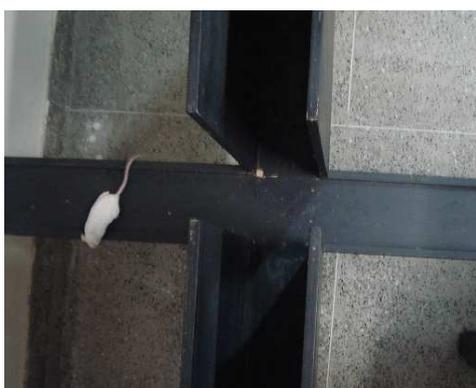
Para este experimento os camundongos foram divididos em quatro grupos com oito animais cada e tratados via intraperitoneal com solução salina 0,9% (grupo controle), LCNa nas doses de 0,1, 1 e 10 mg/kg (grupos LCNa 0,1, 1 e 10 respectivamente) e com diazepam na dose de 2 mg/kg (controle positivo). Após 30 minutos dos tratamentos, os animais foram colocados, um por vez, no equipamento. O aparato usado é feito de acrílico dividido em 2 compartimentos (campo claro e campo escuro) que se comunicam por meio de uma pequena porta (CRAWLEY, 1985). O campo escuro (acrílico preto, 27 x 18 x 29 cm) é pobremente iluminado. O campo claro (acrílico transparente, 27 x 18 x 29 cm) é iluminado pela luz do ambiente. O animal foi observado por 5 minutos. O parâmetro utilizado é o tempo de permanência em segundos no campo claro.



Fonte: Arquivo Pessoal

### Teste do labirinto em cruz elevado

Para este experimento os camundongos foram divididos em quatro grupos com oito animais cada e tratados via intraperitoneal com solução salina 0,9% (grupo controle), LCNa nas doses de 0,1, 1 e 10 mg/kg (grupos LCNa 0,1, 1 e 10 respectivamente) e com diazepam na dose de 2 mg/kg (controle positivo). O labirinto em cruz elevado para camundongos (LISTER, 1987) consiste de dois braços abertos opostos (30 x 5 cm) e dois fechados (30 x 5 x 25 cm), também opostos, em forma de cruz. Os braços abertos e fechados estão conectados entre si por uma plataforma central (5 x 5 cm), elevada a 45 cm do chão. Após 30, os animais foram colocados no centro do aparelho com a cabeça voltada para um dos braços fechados e o seu comportamento observado por 5 minutos. As medidas comportamentais registradas no LCE foram: número de entradas nos braços abertos e braços fechados (NEBA e NEBF) e tempo de permanência do animal em cada um desses braços (TPBA e TPBF).



Fonte: Arquivo Pessoal



Fonte: Arquivo Pessoal

### Análises estatísticas

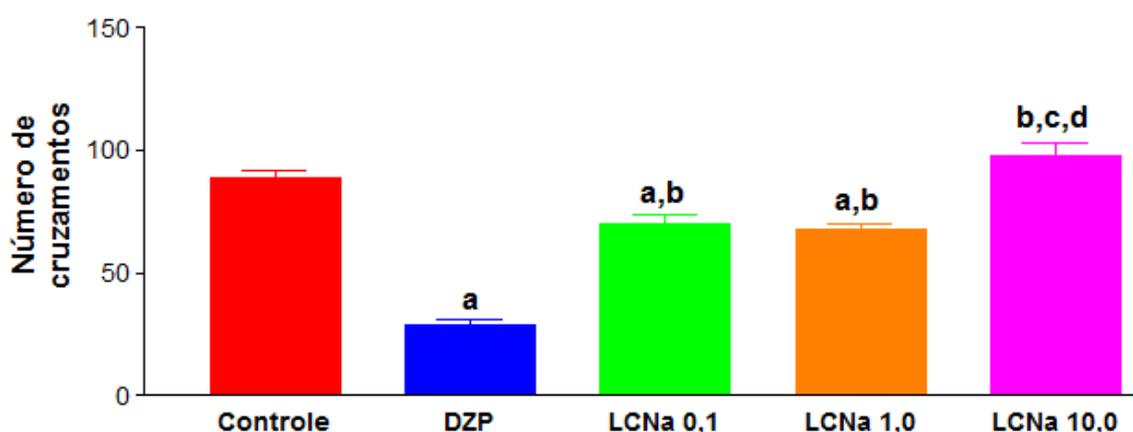
Os valores foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (E.P.M.) do número de animais usados nos experimentos. As diferenças entre os grupos foram

determinadas por meio da Análise de Variância (ANOVA), seguida, quando detectada diferença, pelo teste *t*-Student-Newman-Keuls com *post hoc* teste. O nível de significância para rejeição da hipótese de nulidade foi sempre  $\geq$  a 5 %.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

No teste do campo aberto, foi verificada uma diminuição de 67,37% no número de cruzamentos dos camundongos tratados com diazepam ( $29,00 \pm 1,80$ ) em relação ao grupo controle ( $88,86 \pm 3,10$ ). O grupo tratado com LCNa na dose de 0,1 mg/kg ( $70,14 \pm 3,384$ ) apresentou uma redução de 21,07% no número de cruzamentos em relação ao grupo controle e um aumento de 141,86% quando comparado ao grupo tratado com diazepam. O grupo tratado com LCNa na dose de 1,0 mg/kg ( $67,71 \pm 2,21$ ) demonstrou uma diminuição do número de cruzamentos de 23,8% quando comparado ao grupo controle e uma diminuição de 3,47% quando comparado ao grupo LCNa 0,1. O grupo LCNa 10,0 ( $97,86 \pm 5,32$ ) mostrou um aumento de 10,13% quando comparado ao grupo controle e um aumento de 39,54% quando comparado ao grupo LCNa 0,1 mg/kg (Figura 1).

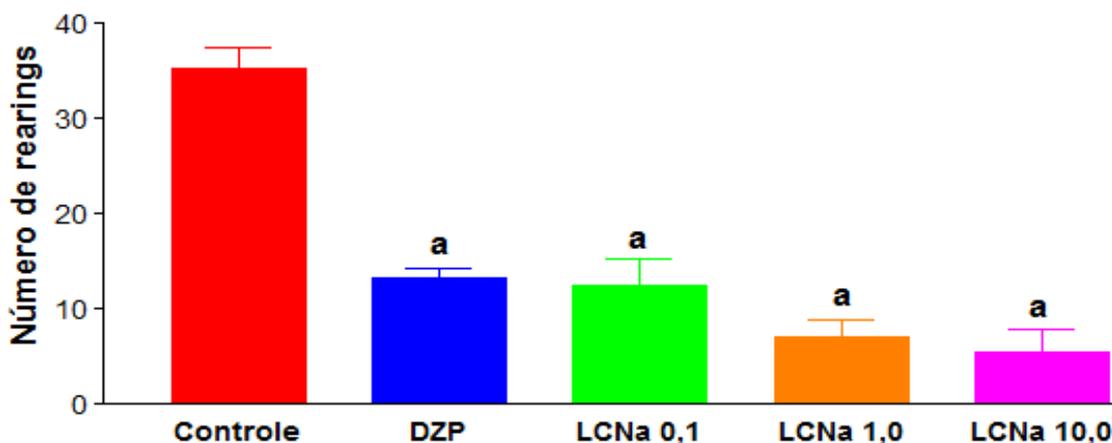
**Figura 1:** Efeito de LCNa nas doses de 0,1, 1 e 10 mg/kg no número de cruzamentos dos camundongos.



Os valores são a média  $\pm$  S.E.M. do tempo de número de cruzamentos de 8 camundongos (por grupo) utilizados nos experimentos. <sup>a</sup> $p < 0,05$  (ANOVA seguido de teste *t*-Student-Newman-Keuls com *post hoc* teste), significativamente diferente do controle. <sup>b</sup> $p < 0,05$  (ANOVA seguido de teste *t*-Student-Newman-Keuls com *post hoc* teste), significativamente diferente do grupo tratado com diazepam. <sup>c</sup> $p < 0,05$  (ANOVA seguido de teste *t*-Student-Newman-Keuls com *post hoc* teste), significativamente diferente do grupo LCNa 0,1. <sup>d</sup> $p < 0,05$  (ANOVA seguido de teste *t*-Student-Newman-Keuls com *post hoc* teste), quando comparado ao grupo LCNa 1.

Em relação ao número de rearings, o grupo tratado com diazepam ( $13,29 \pm 1,063$ ) apresentou uma diminuição de 62,44% em relação ao grupo controle ( $35,38 \pm 2,17$ ). O grupo tratado com LCNa na dose de 0,1 mg/kg ( $12,43 \pm 2,93$ ) mostrou diminuição de 64,87 e 6,47% em relação aos grupos controle e diazepam respectivamente. O grupo tratado com LCNa na dose de 1,0 mg/kg ( $7,0 \pm 1,96$ ) demonstrou uma diminuição de 80,22 e 47,29% em relação aos grupos controle e diazepam respectivamente. No grupo tratado com LCNa na dose de 10 mg/kg ( $5,57 \pm 2,36$ ) houve diminuição de 84,26 e 58,09% em relação aos grupos controle e diazepam respectivamente. Não houve relação de significância entre as doses testadas (figura 2).

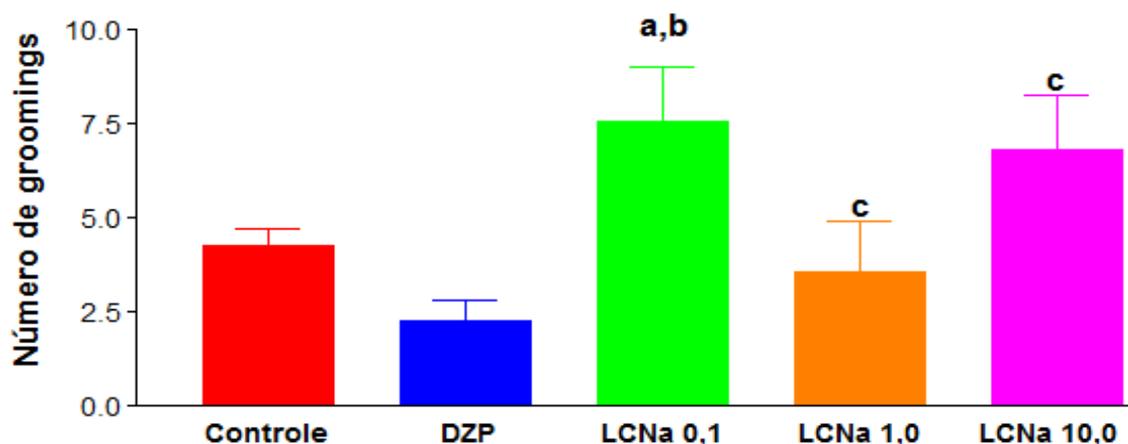
**Figura 2:** Efeito de LCNa nas doses de 0,1, 1 e 10 mg/kg no número de *rearings* dos camundongos.



Experimentos realizados, conforme descrito no procedimento experimental. LCN foi administrado via intraperitoneal. Os valores são a média  $\pm$  S.E.M. do número de rearings de 8 camundongos (por grupo) utilizados nos experimentos.  $p < 0,01$  (ANOVA seguido de teste *t*-Student-Newman-Keuls com *post hoc* teste), significativamente diferente do controle.

Quanto ao número de groomings, não houve alteração significativa entre o grupo tratado com diazepam ( $2,29 \pm 0,522$ ) e o grupo controle ( $4,25 \pm 0,49$ ). O grupo tratado com LCNa na dose de 0,1 mg/kg ( $11,43 \pm 2,79$ ) mostrou um aumento de 168,94 e 399,13% em relação aos grupos controle e diazepam respectivamente. No grupo tratado com LCNa na dose 1,0 mg/kg ( $3,57 \pm 1,34$ ) houve diminuição de 68,77% em relação ao grupo tratado com LCNa na dose de 0,1 mg/kg. O grupo tratado com LCNa na dose de 10,0 mg/kg ( $4,86 \pm 2,14$ ) mostrou diminuição de 57,48% em relação ao grupo tratado com LCNa na dose 0,1 mg/kg.

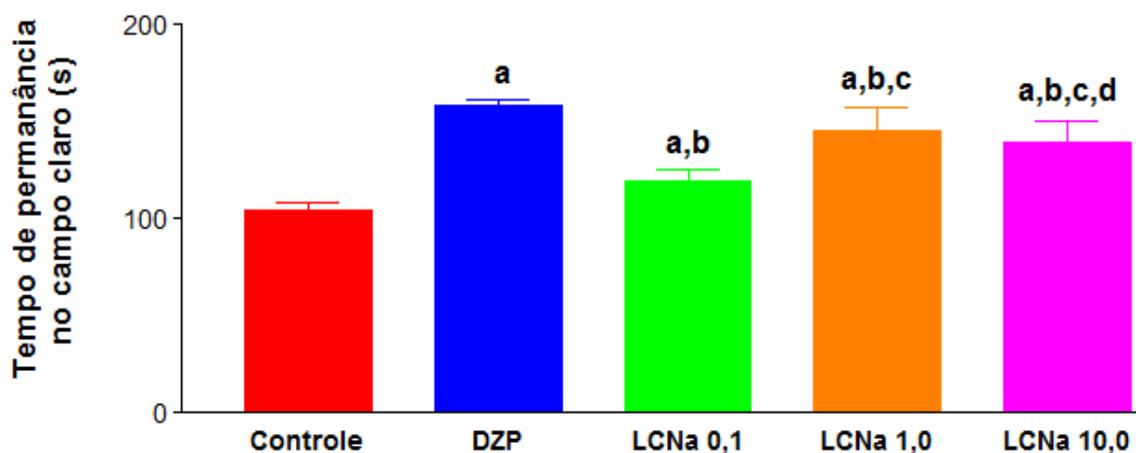
**Figura 3:** Efeito de LCNa nas doses de 0,1, 1 e 10 mg/kg no número de *groomings* dos camundongos.



Os valores são a média  $\pm$  S.E.M. do número de groomings de 8 camundongos (por grupo) utilizados nos experimentos. <sup>a</sup> $p < 0,05$  (ANOVA seguido de teste *t*-Student-Newman-Keuls com *post hoc* teste), significativamente diferente do controle. <sup>b</sup> $p < 0,05$  (ANOVA seguido de teste *t*-Student-Newman-Keuls com *post hoc* teste), significativamente diferente do grupo tratado com diazepam. <sup>c</sup> $p < 0,05$  (ANOVA seguido de teste *t*-Student-Newman-Keuls com *post hoc* teste), significativamente diferente do grupo LCNa 0,1.

No teste do claro e escuro observou-se que nos animais tratados com diazepam (158,1 s) houve um aumento de 51,73% no tempo de permanência no campo claro em relação aos animais do grupo controle (104,2 s). O grupo LCNa 0,1 (119,5 s) mostrou um aumento de 14,35% em relação ao grupo controle e uma diminuição de 24,42% em relação ao grupo tratado com diazepam. Os animais tratados com LCNa na dose de 1 mg/kg (145,4 s) apresentaram um aumento no tempo de permanência no campo claro de 39,54% em relação ao grupo controle, uma diminuição de 8,03% em relação ao animais tratados com diazepam e um aumento de 21,67% em relação aos animais tratados com LCNa na dose de 0,1 mg/kg. Finalmente, o grupo LCNa 10 (139,3 s) mostrou um aumento de 33,68% quando comparado ao grupo veículo, uma diminuição de 11,89% quando comparado ao grupo diazepam, um aumento de 16,57% quando comparado ao grupo LCNa 0,1 e uma diminuição de 4,2% quando comparado ao grupo LCNa 1 (Figura 4).

**Figura 4:** Efeito de LCNa nas doses de 0,1, 1 e 10 mg/kg no tempo de permanência no campo claro dos camundongos.



Os valores são a média  $\pm$  S.E.M. do tempo de permanência na campo claro de 8 camundongos (por grupo) utilizados nos experimentos. <sup>a</sup> $p < 0,05$  (ANOVA seguido de teste *t*-Student-Newman-Keuls com *post hoc* teste), significativamente diferente do controle. <sup>b</sup> $p < 0,05$  (ANOVA seguido de teste *t*-Student-Newman-Keuls com *post hoc* teste), significativamente diferente do grupo tratado com diazepam. <sup>c</sup> $p < 0,05$  (ANOVA seguido de teste *t*-Student-Newman-Keuls com *post hoc* teste), significativamente diferente do grupo LCNa 0,1. <sup>d</sup> $p < 0,05$  (ANOVA seguido de teste *t*-Student-Newman-Keuls com *post hoc* teste), significativamente diferente do grupo LCNa 1.

No teste do labirinto em cruz elevado observou-se um aumento significativo no número de entradas, na porcentagem de entradas, no tempo de permanência e na porcentagem de tempo nos braços abertos dos grupos tratados com diazepam e LCNa nas doses de 0,1, 1 e 10 mg/kg quando comparados ao grupo controle (Tabela 1). Não houve relação de significância entre o grupo tratado com diazepam e os grupos tratados com LCNa.

**Tabela 1:** Efeito de LCNa nas doses de 0,1, 1 e 10 mg/kg no número de entradas, porcentagem de entradas, tempo de permanência e porcentagem de tempo nos braços abertos dos camundongos no labirinto em cruz elevado.

	NEBA	PEBA	TPBA	PTBA
<b>Controle</b>	10,67 ± 0,74	40,00 ± 2,25	122,5 ± 6,37	40,75 ± 2,16
<b>DZP</b>	15,71 ± 0,28 <sup>a</sup>	75,43 ± 2,08 <sup>a</sup>	208,4 ± 3,57 <sup>a</sup>	69,25 ± 1,26 <sup>a</sup>
<b>LCNa 0,1</b>	15,97 ± 0,57 <sup>a</sup>	76,20 ± 2,36 <sup>a</sup>	194,3 ± 5,32 <sup>a</sup>	64,89 ± 2,43 <sup>a</sup>
<b>LCNa 1</b>	16,47 ± 0,62 <sup>a</sup>	79,07 ± 2,72 <sup>a</sup>	205,5 ± 7,81 <sup>a</sup>	68,28 ± 3,21 <sup>a</sup>
<b>LCNa 10</b>	14,69 ± 0,78 <sup>a</sup>	70,53 ± 3,35 <sup>a</sup>	202,3 ± 4,76 <sup>a</sup>	64,15 ± 2,19 <sup>a</sup>

Os valores foram a média ± E.P.M. do número de entradas nos braços abertos (NEBA), porcentagem de entradas nos braços abertos (PEBA), tempo de permanência nos braços abertos (TPBA) e porcentagem de tempo nos braços abertos (PTBA) de 8 camundongos (por grupo) utilizados nos experimentos.<sup>a</sup>p <0,01 (ANOVA teste *t*-Student-Newman-Keuls com *post hoc* teste), significativamente diferente quando comparado ao grupo controle.

Na clínica, a ansiedade costuma ser diagnosticada por meio de relatos dos portadores de transtornos do humor, o que demonstra a natureza subjetiva do transtorno e constitui um desafio para o desenvolvimento de modelos animais para essas patologias. Todavia, a partir do surgimento de medicamentos ansiolíticos, que possibilitaram a validação farmacológica dos testes, e de uma melhor compreensão dos mecanismos da fisiopatologia da doença, a aplicação de experimentos que mimetizam a ansiedade recebeu um impulso considerável (LACERDA, 2006). Assim, os modelos animais de ansiedade são atualmente aplicados com dois objetivos, a saber avaliação dos efeitos ansiolíticos ou ansiogênicos de compostos, assim como identificação dos seus mecanismos de ação e estudo da neurobiologia da doença.

Existem mais de trinta modelos animais de ansiedade. Alguns são baseados em respostas fisiológicas (hipertermia), endócrinas (corticosterona plasmática) e na reação ao estresse, mas a maioria dos modelos é de natureza comportamental. Modelos comportamentais podem ser classificados como respostas condicionadas ou incondicionadas a estímulos capazes de causar ansiedade em humanos. Os modelos condicionados permitem um controle bastante preciso das bases comportamentais,

fazendo uso de privação de água e alimento, aplicações de choques elétricos e necessitando de um tempo considerável de treinamento do animal. Já os modelos não condicionados envolvem apenas o comportamento espontâneo dos animais e por isso estão sujeitos a maior variabilidade, mas permitem uma análise mais aprofundada do "perfil comportamental" de intervenções experimentais (RODGERS *et al*, 1997). Os três modelos utilizados (teste do campo aberto, claro e escuro e labirinto em cruz elevado) são classificados como não condicionados.

Nos últimos 50 anos, os ansiolíticos benzodiazepínicos foram os medicamentos de primeira escolha para a terapia da ansiedade. Contudo, apesar de apresentarem benefícios bem descritos e caracterizados, os benzodiazepínicos também podem provocar inúmeros efeitos colaterais, como: sedação, relaxamento muscular, amnésia anterógrada e dependência física, o que leva os pacientes a buscar outras alternativas terapêuticas (SOUSA *et al*, 2008). Como sedação e relaxamento muscular estão entre os principais incômodos relatados pelos pacientes submetidos a tratamentos contra ansiedade, é de vital importância que as novas formulações ansiolíticas não apresentem essas reações adversas. Assim, o teste do campo aberto é extremamente necessário nas pesquisas de novos compostos contra o transtorno supracitado, uma vez que promove a avaliação da atividade motora do animal, detectando se a administração do composto testado causou alterações no estado de consciência ou no tônus muscular dos camundongos.

O teste do claro e escuro utiliza o número de transições feitas por roedores entre dois compartimentos de uma caixa experimental, um deles bem iluminado (campo claro) e o outro com iluminação reduzida (campo escuro), como parâmetro para aferir a ansiedade no animal. Nesse modelo, a ansiedade é gerada pelo conflito resultante da tendência de explorar ambos os compartimentos e a aversão inata dos animais por ambientes iluminados. Deste modo, o aumento nas transições claro-escuro, bem como, o aumento na permanência do animal no campo claro são indicativos da atividade ansiolítica da formulação (CRUZ *et al*, 1997).

O teste do labirinto em cruz elevado é um modelo animal de ansiedade desenvolvido na década de 80 como uma versão modificada de um modelo denominado labirinto em Y. O aparato é composto por um X de madeira elevado aproximadamente a 50 cm do chão e dotado de dois braços abertos e dois fechados por paredes e opostos entre si. Sua utilização como medida de ansiedade é baseada na aversão natural de

roedores por lugares abertos. Quanto maior a capacidade exploratória do animal e quanto mais tempo ele permanecer nos braços aberto, menor os seus níveis de ansiedade. A validade do labirinto em cruz elevado como modelo animal de ansiedade é baseada na sua sensibilidade a inúmeros agentes ansiolíticos e ansiogênicos, bem como a tratamentos estressores como nado forçado, isolamento e choques, entre outros (GOUVEIA JÚNIOR; MORATO, 2002).

Os antagonistas dos canais de cálcio são fármacos que inibem a entrada de cálcio nas células através do bloqueio dos canais voltagem-dependentes. Esses canais parecem estar presentes em todos os neurônios e tem a finalidade de fornecer a quantidade de íons cálcio necessária para a liberação dos neurotransmissores. Existem evidências que os antagonistas do cálcio podem exercer efeitos sobre a função neural e estudos realizados com bloqueadores desses canais pertencentes ao grupo das diidropiridinas, sugerem que os medicamentos apresentam alta afinidade pelos sítios de membrana no cérebro. Nesse sentido, pesquisas mostraram que a nimodipina é eficaz no tratamento de distúrbios afetivos, provocando uma melhora nos sintomas depressivos e maníacos, assim com na terapia de mudanças de comportamento induzidas por opiáceos, dos sintomas de abstinência em ratos dependentes de álcool, além de apresentar atividade anticonvulsivante (MARTÍN *et al*, 1996).

Nossos resultados indicam que a administração da formulação lipossomal contendo nimodipina não apresenta efeito sedativo ou relaxante muscular nos animais, uma vez que não reduziu o número de cruzamentos, *rearings* e *groomings*. O aumento de permanência dos grupos LCN no campo claro, assim como o aumento no número de entradas, porcentagem de entradas, tempo de permanência e porcentagem de tempo nos braços abertos dos animais tratados com LCN também sugerem uma possível diminuição nos níveis de ansiedade dos animais tratados com a formulação, confirmando os resultados observados no teste do campo aberto.

## CONCLUSÃO

A administração da formulação lipossomal contendo nimodipina (LCNa) não produziu sedação e relaxamento muscular nos camundongos e apresentou atividade ansiolítica nos testes do campo aberto, do claro e escuro e do labirinto em cruz elevado. Essa atividade precisa ser melhor investigada com o uso do antagonista e comparada aos resultados do principio ativo isolado.

**REFERÊNCIAS**

ANDRADE, C.A.S; CORREIA, M.T.S.; COELHO, L.C.B.B.; NASCIMENTO, S.C.; SANTOS-MAGALHÃES, N.S. Antitumor activity of *Cratylia mollis* lectin encapsulated into liposomes. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 278, p. 435–445, 2004.

ANDRADE, L.H.S.G.; GORESTREIN, C. Aspectos gerais das escalas de avaliação de ansiedade. **Revista de Psiquiatria Clínica**, v. 25, n. 6, p. 285-290, 1998.

ARCHER, J. Tests for emotionality in rats and mice. A review. **Animal Behaviour**, v. 21, p. 205-235, 1973.

BARROS, A.L.B.L., HUMEREZ, D.C.; FAKIH, F.T.; MICHEL, J.L.M. Situações geradoras de ansiedade e estratégias para seu controle entre enfermeiras: estudo preliminar. **Revista Latino-americana de Enfermagem**, v.5, p.585-592, 2003

CRAWLEY, J. N. Exploratory behavior models of anxiety in mice. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 9, p. 37-44, 1985.

CRUZ, A.P.M.; ZAGROSSI-JÚNIOR,H.; GRAEFF, F.G.; LANDEIRA-FERNANDES, J. Modelos animais de ansiedade: Implicações para seleções de drogas ansiolíticas. **Psicologia: Teoria e Pesquisa**, v. 13, p. 269-278, 1997.

GOUVEIA JÚNIOR, A.; MORATO, S. Influências do ciclo estral sobre o desempenho de ratos no labirinto em cruz elevado. **Interação em Psicologia**, v.6, p.141-148, 2002.

MARTÍN, M.I.; DEL VAL,V.L.; COLADO, M.I.; GOICOECHEA, C.; ALFARO, M.G. Behavioral and analgesic effects induced by administration of nifedipine and nimodipine. **Pharmacology Biochemistry & Behavior**, v..55, p.93-98, 1996

LACERDA, G.F.M.L. **Ansiedade em modelos animais: efeito de drogas nas dimensões extraídas da análise fatorial**. 2006. Dissertação (Mestrado em

Farmacologia) - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

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

RODGERS, R. J.; CAO, B. J.; DALVI, A.; HOLMES, A. Animal models of anxiety on ethological perspective. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 30, p. 289-304, 1997.

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

SEO, J.; LEE, S.; LEE, J.; KWON, B.; MA, Y.; HWANG, B.; HONG, J. OH, K. Anxiolytic-like effects of obovatol isolated from *Magnolia obovata*: Involvement of GABA/benzodiazepine receptors complex. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 31, p. 1363–1369, 2007.

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

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

ZANINI, A.C.; OGA, S. **Guia de medicamentos - uso racional de medicamentos**. Editora Atheneu. São Paulo, 1995

**Estudos da atividade antidepressiva de uma formulação lipossomal contendo  
nimodipina (LCNa)**

**<sup>1</sup>MORENO, LCGAI; <sup>2</sup>CAVALCANTI, IMF; <sup>2</sup>SANTOS-MAGALHÃES, NS;  
<sup>1</sup>FREITAS, RM; <sup>1</sup>SANTOS, HMLR**

<sup>1</sup>Laboratório de Pesquisa em Neuroquímica Experimental do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Piauí. Campus Ministro Petrônio Portela, 64.049-550, Teresina – PI, Brasil.

<sup>2</sup>Laboratório de Imunopatologia Keizo-Asami da Universidade Federal de Pernambuco. Av. Prof. Moraes Rego, s/n, Cidade Universitária, 50670-901, Recife-PE, Brasil.

## RESUMO

Os sentimentos de alegria e tristeza são de ocorrência natural na existência humana, no entanto, quando a tristeza ultrapassa o limiar da normalidade observamos o desenvolvimento da depressão. Estudos demonstraram que o aumento do fluxo de cálcio através das membranas, com conseqüente elevação das concentrações intracelulares desse íon, pode desempenhar um papel importante na fisiopatologia dos transtornos afetivos. Além disso, foi comprovado que alguns antidepressivos tricíclicos provocam um bloqueio nos canais de cálcio, indicando que esse mecanismo pode contribuir para os seus efeitos terapêuticos. A nimodipina, fármaco pertencente ao grupo das diidropiridina que apresenta alta lipofilicidade e por isso atinge facilmente o sistema nervoso central, mostrou efeitos antidepressivos em ensaios realizados em animais. Entretanto, a administração oral do fármaco é limitada pelo fato da molécula apresentar baixa solubilidade aquosa e alto metabolismo de primeira passagem hepático, o que ocasiona baixa biodisponibilidade. A encapsulação de fármacos em lipossomas constitui um método alternativo para a solubilização de compostos que apresentem toxicidade elevada, sejam fotossensíveis ou não mostrem solubilidade para a administração na forma livre. Assim, foi produzida uma formulação lipossomal derivada de nimodipina (LCNa) e seus efeitos foram testados em dois modelos animais de depressão: teste de suspensão pela cauda e teste do nado forçado. A redução do tempo de imobilidade dos grupos de camundongos tratados com LCNa nas doses de 0,1, 1 e 10 mg/kg em ambos os testes indicam um possível efeito antidepressivo da formulação. Os resultados dos testes do animais tratados com associações de LCN com imipramina, paroxetina e reserpina sugerem que o mecanismo de ação da formulação esteja possivelmente envolvido com um bloqueio na recaptação da noradrenalina e serotonina.

**Palavras-chave:** efeito antidepressivo, lipossomas, nimodipina.

## **ABSTRACT**

The feelings of joy and sadness are naturally occurring in human existence, however, when grief crosses the threshold of normality are seeing the development of depression. Studies have shown that increased calcium flux across membranes, with consequent elevation of intracellular concentrations of this ion may play an important role in the pathophysiology of affective disorders. Moreover, it was shown that some tricyclic antidepressants cause a blockage of calcium channels, indicating that this mechanism may contribute to their therapeutic effects. The nimodipine, a drug belonging to the dihydropyridine group that has a high lipophilicity and therefore easily reaches the central nervous system, showed antidepressant effects in tests on animals. However, oral administration of the drug is limited by the fact that the molecule have low aqueous solubility and high first pass liver metabolism, which leads to low bioavailability. The encapsulation of drugs into liposomes is an alternative method for the solubilization of compounds that have high toxicity, are photosensitive or not show solubility for administration in free form. Thus was produced a liposomal formulation derived from nimodipine (LCNa) and their effects were tested in two animal models of depression: the tail suspension test and forced swimming test. The reduction of immobility time of the groups treated with LCNa mice at doses of 0.1, 1 and 10 mg / kg in both tests indicate a possible antidepressant effect of the formulation. The test results of animals treated with combinations of LCN with imipramine, paroxetine, and reserpine suggest that the mechanism of action of the formulation is possibly involved in a blockade of the reuptake of norepinephrine and serotonin.

**Keywords:** antidepressant effect, liposomes, nimodipine.

## INTRODUÇÃO

Os sentimentos de alegria e tristeza são de ocorrência natural na existência humana. No entanto, quando a tristeza ultrapassa o limiar da normalidade observamos o desenvolvimento da depressão. A doença é caracterizada por uma série de sintomas, entre os quais podemos citar: humor depressivo (sensação de tristeza, autodesvalorização e sentimentos de culpa), redução da capacidade de experimentar prazer nas atividades antes consideradas agradáveis, fadiga ou sensação de perda de energia, diminuição da capacidade de pensar, de se concentrar ou de tomar decisões, alterações do sono (insônia ou hipersonolência), alterações do apetite (perda ou aumento do apetite) e redução do interesse sexual (DEL PORTO, 1999).

Estudos demonstram que o aumento do fluxo de cálcio através das membranas, com conseqüente elevação das concentrações intracelulares desse íon, pode desempenhar um papel importante na fisiopatologia dos transtornos afetivos. Nesse contexto, alguns bloqueadores dos canais de cálcio, a exemplo do verapamil e diltiazem, foram administrados em estudos clínicos e apresentaram efeito na terapia de transtornos do humor. Além disso, foi comprovado que alguns antidepressivos tricíclicos provocam um bloqueio nos canais de cálcio, indicando que esse mecanismo pode contribuir para os seus efeitos terapêuticos (GRUNZE *et al*, 1996).

A nimodipina, fármaco pertencente ao grupo das diidropiridinas que apresenta alta lipofilicidade e por isso atinge facilmente o sistema nervoso central (SNC), mostrou efeitos antidepressivos em ensaios realizados em animais (KATAGIRI *et al*, 2001). Entretanto, a administração oral do fármaco é limitada pelo fato da molécula apresentar baixa solubilidade aquosa e alto metabolismo de primeira passagem hepático, o que ocasiona baixa biodisponibilidade. Uma solução para esse problema seria a administração endovenosa de nimodipina, entretanto como o medicamento não é solúvel em água seria necessária a sua solubilização em metanol. Como o álcool causa irritação grave nos vasos sanguíneos essa prática torna-se contra-indicada (WANG *et al*, 2006; YU; HE; TANG, 2006).

A encapsulação de fármacos em lipossomas constitui um método alternativo para a solubilização de compostos que apresentem toxicidade elevada, sejam fotossensíveis ou não mostrem solubilidade para a administração na forma livre (SANTOS, 2005). Esses nanossistemas têm mostrado a capacidade de melhorar a

farmacocinética e farmacodinâmica das moléculas encapsuladas. Assim, foi produzida uma formulação lipossomal contendo nimodipina e seus efeitos foram testados em dois modelos animais de depressão: teste de suspensão pela cauda e teste do nado forçado.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Produção da formulação lipossomal contendo nimodipina (LCNa)**

Os lipossomas contendo nimodipina foram preparados usando o método da hidratação do filme lipídico (ANDRADE *et al*, 2004). Os lipossomas sem carga (LCNa) foram produzidos utilizando os lipídeos fosfatidilcolina de soja e colesterol (proporção de 8:2) e 0,010 g de nimodipina para a obtenção de uma formulação lipossomal com concentração lipídeos de 117,6 mM e concentração do fármaco de 1,0 mg/mL. Esses constituintes foram solubilizados em uma mistura de clorofórmio:metanol (3:1 v/v), sob agitação magnética. Os solventes foram removidos por evaporação a vácuo, utilizando o rotaevaporador por 60 min ( $37 \pm 1$  °C, 80 rpm), resultando em um filme lipídico. Este filme foi, então, hidratado com 10 mL de solução tampão fosfato pH 7,4 produzindo assim vesículas multilamelares grandes. A suspensão lipossomal foi então submetida à sonicação por sonda ultrassônica (Vibra Cell, BRANSON, EUA) a 200 W e 40 Hz para 300 s para a obtenção de lipossomas unilamelares pequenos.

### **Estudos da possível atividade antidepressiva de LCNa**

#### **Animais**

Foram utilizados camundongos *Swiss* machos com 2 meses de idade e com peso de 25 a 30 g, provenientes do Biotério Central do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Piauí. Os animais destinados ao experimento permaneceram nas dependências do Laboratório de Pesquisa em Neuroquímica Experimental, por sete dias, para a adequada aclimatação. As unidades experimentais receberam água e dieta (Labina<sup>®</sup>) *ad libitum* e foram mantidos sob condições controladas de iluminação (ciclo 12 h claro/escuro) e temperatura ( $25 \pm 1$  °C). Os protocolos experimentais e procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal do Piauí (CEEA / UFPI N° 014/11).

### **Teste de suspensão pela cauda**

Cinco grupos de 8 camundongos cada foram tratados via intraperitoneal com solução salina 0,9% (grupo controle), LCN nas doses de 0,1, 1 e 10 mg/kg (LCN 0,1, LCN 1, LCN 10 respectivamente) e imipramina na dose de 50 mg/kg (controle positivo). Após 30 minutos dos tratamentos, os animais, um por vez, foram suspensos e presos com uma fita adesiva, a cerca de 1 cm da ponta da cauda, numa plataforma 58 cm acima da bancada, durante 6 minutos (STERU, 1985). O parâmetro observado foi o tempo de imobilidade do animal, em segundos.



Fonte: Arquivo Pessoal

### **Teste do nado forçado**

Seis grupos de 8 camundongos cada foram tratados via intraperitoneal com solução salina 0,9% (grupo controle), LCN nas doses de 0,1, 1 e 10 mg/kg (LCN 0,1, LCN 1 e LCN 10 respectivamente), imipramina na dose de 50 mg/kg, paroxetina na dose de 20 mg/kg e reserpina na dose de 0,25 mg/kg (controles positivos). Para o estudo do efeito da associação da formulação testada com drogas antidepressivas e reserpina três grupos receberam LCN via intraperitoneal na dose de 0,1 mg/kg para posteriormente receber imipramina na dose de 50 mg/kg (grupo LCN 0,1 + IMI 50), paroxetina na dose de 20 mg/kg (grupo LCN 0,1 + PAROX 20) e reserpina na dose de 0,25 mg/kg (grupo LCN 0,1 + RESERP 0.25). Após 30 minutos dos tratamentos os camundongos, um por vez, foram acondicionados em um cilindro transparente cheio de água por 5 minutos. (PORSOLT, 1977). O tempo de imobilidade em segundos foi determinado.



Fonte: Arquivo Pessoal

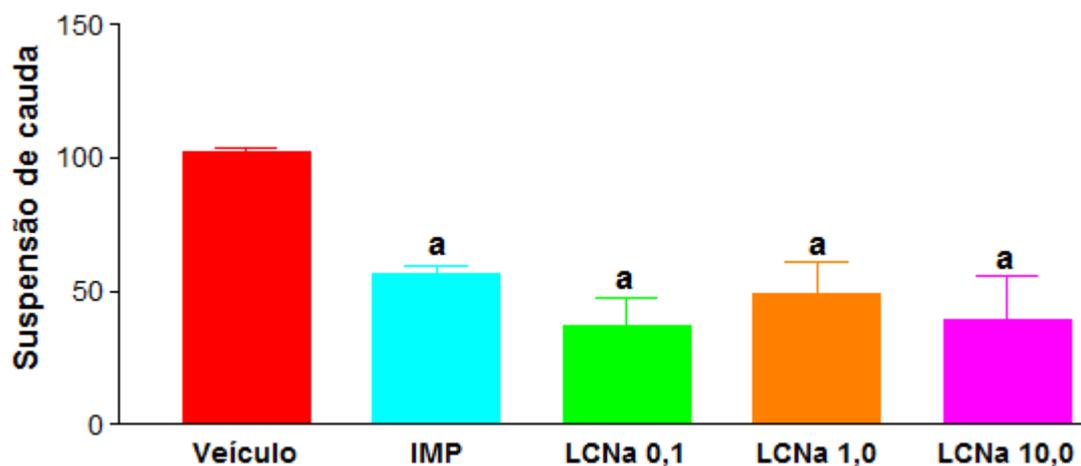
### **Análises estatísticas**

Os valores foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (E.P.M.) do número de animais usados nos experimentos. As diferenças entre os grupos foram determinadas por meio da Análise de Variância (ANOVA), seguida, quando detectada diferença, pelo teste t-Student-Newman-Keuls com *post hoc* teste. O nível de significância para rejeição da hipótese de nulidade foi sempre  $\geq$  a 5 %.

### **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

No teste de suspensão pela cauda houve uma diminuição de 44,62% no tempo de imobilidade dos animais tratados com imipramina (56,51 s) em relação aos animais tratados com o veículo (102,4 s). O grupo tratado com LCNa 0,1 (36,88 s) apresentou uma diminuição de 63,99% do tempo de imobilidade também em relação ao grupo controle. Os camundongos que receberam LCNa 1 (49,25 s) mostraram uma diminuição no tempo de imobilidade de 51,91% em relação aos camundongos que receberam o veículo. Por fim, no grupo tratado com LCNa 10 (39,38 s) houve uma diminuição de 61,55% do tempo de imobilidade em relação ao grupo controle (Figura 1). A diminuição do tempo de imobilidade dos camundongos tratados com LCNa em relação aos animais que receberam solução salina (grupo controle) indica um possível efeito antidepressivo da formulação. Não houve diferença significativa no tempo de imobilidade dos animais tratados com LCNa quando comparados com os camundongos tratados com imipramina.

**Figura 1:** Efeito de LCNa nas doses de 0,1, 1 e 10 mg/kg no tempo de imobilidade dos camundongos no teste da suspensão pela cauda.



Os valores são a média  $\pm$  S.E.M. do tempo de imobilidade de 8 camundongos (por grupo) utilizados nos experimentos.  $p < 0,01$  (ANOVA seguido de teste *t*-Student-Newman-Keuls com *post hoc* teste), significativamente diferente do controle.

No teste do nado forçado os animais que foram tratados com LCNa mostraram uma diminuição significativa no tempo de imobilidade quando comparados ao grupo controle. Essa redução foi inversamente proporcional à dose, o que sugere um efeito dose-dependente. Mesmo a média do tempo de imobilidade do grupo LCNa 0,1 ( $21.75 \pm 5.85$ ) foi menor do que a média do tempo de imobilidade dos animais tratados com os antidepressivos imipramina e paroxetina ( $75.00 \pm 0,68$  e  $133.0 \pm 3.28$  respectivamente), o que indica a possibilidade do desenvolvimento de uma terapia que necessite de pequenas quantidades da formulação. Além disso, o resultado dos testes dos animais tratados com associações de LCNa com imipramina e paroxetina (LCN 0,1+ IMI 50 e LCN 0,1 + PAROX 20) indica uma possível sinergia nos efeitos dos fármacos. Já o resultado dos animais tratados com associações de LCNa 0,1 e reserpina mostram que os fármacos têm efeitos contrários (LCN 0,1 + RESERP 0.25).

**Tabela 1:** Efeito de LCNa no tempo de imobilidade de camundongos no teste do nado forçado.

Grupos	Tempo de Imobilidade (s)	Valores de Imobilidade (%)
Veículo	224.3 ± 0.86	-
IMI 50	75.00 ± 0,68 <sup>a</sup>	↓ 66,57 <sup>a</sup>
PAROX 20	133.0 ± 3.28 <sup>a</sup>	↓ 49,63 <sup>a</sup>
RESERP 0.25	263.70 ± 2.15 <sup>a</sup>	↑ 17,5 <sup>a</sup>
LCNa 0,1	21.75 ± 5.85 <sup>a</sup>	↓ 90,3 <sup>a</sup>
LCNa 1	5.07 ± 1.98 <sup>a,b</sup>	97,74 <sup>a</sup> ↓ 76,29 <sup>b</sup>
LCNa 10	2.0 ± 0.74 <sup>a,b,c</sup>	↓99,11 <sup>a</sup> ↓ 90,81 <sup>b</sup> ↓ 60,55 <sup>c</sup>
LCNa 0,1+ IMI 50	18.40 ± 9.35 <sup>a,b,e</sup>	↓ 91,8 <sup>a</sup> ↓ 15,4 <sup>b</sup> ↓75,48 <sup>e</sup>
LCNa 0,1 + PAROX 20	59.00 ± 10.05 <sup>a,b,f</sup>	↓ 73,7 <sup>a</sup> ↑171,26 <sup>b</sup> ↑55,64 <sup>f</sup>
LCNa 0,1 + RESERP 0.25	57.80 ± 9.58 <sup>a,b,i</sup>	↓ 74,23 <sup>a</sup> ↑165,75 <sup>b</sup> ↓ 78,09 <sup>i</sup>

Os valores são a média ± S.E.M. do tempo de imobilidade de 8 camundongos (por grupo) utilizados nos experimentos. <sup>a</sup>p <0,05 (ANOVA seguido de teste *t*-Student-Newman-Keuls com *post hoc* teste), significativamente diferente do controle. <sup>b</sup>p<0.005 (ANOVA seguido de teste *t*-Student-Newman-Keuls com *post hoc* teste), significativamente diferente do grupo LCNa 0,1. <sup>c</sup>p<0.05 (ANOVA seguido de teste *t*-Student-Newman-Keuls com *post hoc* teste), significativamente diferente do grupo LCNa 1. <sup>d</sup>p<0.05 (ANOVA seguido de teste *t*-Student-Newman-Keuls com *post hoc* teste), significativamente diferente do grupo LCNa 10. <sup>e</sup>p<0.05 (ANOVA seguido de teste *t*-Student-Newman-Keuls com *post hoc* teste), significativamente diferente do grupo IMI 50. <sup>f</sup>p<0.05 (ANOVA seguido de teste *t*-Student-Newman-Keuls com *post hoc* teste), significativamente diferente do grupo PAROX 20. LCN = formulação lipossomal contendo nimodipina ; IMI = imipramina; PAROX = paroxetina; RESERP = reserpina. LCN e os fármacos foram administrados 30 minutos antes da realização do teste.

Estudos realizados em animais são de fundamental importância para a melhor compreensão da fisiopatologia das doenças mentais e para o desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas. Apesar de não existir um modelo animal uma condição que corresponda exatamente ao estado de depressão em humanos, sabe-se que existem procedimentos que induzem estados comportamentais semelhantes à patologia em questão (SILVA, 2009).

O teste do nado forçado e o teste de suspensão pela cauda são situações estressantes não escapáveis frequentemente aplicadas em laboratórios para se promover a identificação de compostos que apresentem atividade antidepressiva. Quando os camundongos são forçados a nadar ou são pendurados de cabeça para baixo pela cauda, eles tendem a se tornar imóveis após uma atividade inicial vigorosa. A atividade

vigorosa é considerada um comportamento de fuga do animal e a imobilidade é descrita como um sinal de desespero. Substâncias que reduzem o tempo de imobilidade dos camundongos geralmente apresentam propriedades antidepressivas em seres humanos, por isso os testes têm sido considerados úteis como modelos de depressão em roedores. Assim, o aumento da duração da imobilidade dos animais é considerado indicativo de depressão e, conseqüentemente, a diminuição do período imóvel é sinal de efeito antidepressivo da substância administrada (KAROLEWICZ *et al*, 2001).

Pesquisas demonstram que o fluxo excessivo de cálcio através das membranas que resultam no aumento dos níveis intracelulares do íon pode desempenhar um papel importante na fisiopatologia dos transtornos afetivos. Nesse contexto, alguns bloqueadores dos canais de cálcio, a exemplo do verapamil e do diltiazem, foram administrados em estudos clínicos e apresentaram efeito na terapia de transtornos do humor. Essa teoria foi fortalecida pela detecção de uma elevação nas concentrações de cálcio de plaquetas e linfócitos em pacientes com transtorno bipolar, nos episódios de mania e depressão. Além disso, foi sugerido que alguns antidepressivos tricíclicos vastamente empregados no tratamento de disfunções do humor exercem antagonismo nos canais de cálcio, levantando a possibilidade de que esse mecanismo pode contribuir para seus efeitos terapêuticos (GRUNZE *et al*, 1996).

A nimodipina é um antagonista dos canais de cálcio cerebrocélético. Devido a sua elevada lipofilicidade, a molécula atravessa rapidamente a barreira hematoencefálica atingindo o cérebro. Por conta da sua facilidade em chegar ao SNC, a nimodipina apresenta um potente efeito vasodilatador cerebral, aumentando o fluxo sanguíneo no órgão e constituindo uma excelente opção para o tratamento dos quadros de isquemias presentes em inúmeras patológicas que atingem o cérebro (YANPALLEWAR, *et al*, 2004). Além disso a nimodipina apresenta inúmeros efeitos centrais, a exemplo de propriedades anticonvulsivantes, aumento da capacidade cognitiva de pacientes com demência, aplicabilidade no tratamento de hemorragias cerebrais e transtornos do humor (FRYE *et al*, 2003). Experimentos realizados em animais indicaram que o fármaco apresenta efeitos antidepressivos (KATAGIRI *et al*, 2001). Contudo a molécula apresenta algumas limitações, uma vez que é praticamente insolúvel em água, fotossensível e sua biodisponibilidade oral é baixa (13%) (ZANINI; OGA, 1995). Esses inconvenientes podem ser minimizados pela utilização de carreadores farmacêuticos nanométricos (LIMA, 1995).

Lipossomas são vesículas esféricas fechadas constituídas por uma ou mais bicamadas de fosfolipídeos que circundam uma fase aquosa interna. Devido à sua estrutura, essas vesículas podem encapsular compostos hidrofílicos, no interior do compartimento aquoso, ou moléculas hidrofóbicas, na membrana lipídica. Por conta da sua biocompatibilidade, biodegradabilidade e baixa toxicidade, os lipossomas possuem inúmeras aplicações como carreadores farmacêuticos, mostrando bons resultados na promoção do aumento da biodisponibilidade e diminuição da toxicidade dos medicamentos (LAOUINIA *et al*, 2011). Além disso, esses nanossistemas possibilitam a proteção de fármacos fotossensíveis e a solubilização de moléculas que não mostrem solubilidade para a administração na forma livre.

Nos ensaios foram usados os fármacos imipramina, paroxetina e reserpina como controles positivos. Sabe-se que alterações nas concentrações dos neurotransmissores noradrenalina, serotonina e dopamina têm sido postuladas como as bases biológicas da depressão (SKALISZ *et al*, 2002). A imipramina foi escolhida por ser um antidepressivo tricíclico largamente utilizado desde a década de 1950 e com eficácia comprovada no tratamento da depressão. Entretanto, a administração do fármaco está associada a uma variedade de efeitos colaterais (particularmente efeitos anti- $\alpha$ -adrenérgicos e anticolinérgicos), entre os quais podemos citar: xerostomia, constipação, sedação, prejuízo psicomotor e cognitivo (VAN AMERONGEN; FERREY; TOURNOUX, 2002). Como explicitado anteriormente, o tratamento da patologia também envolve medicamentos que afetam a função serotoninérgica, alterando a recaptção, o catabolismo ou a densidade da serotonina nos receptores. Nesse contexto, a paroxetina é um dos mais potentes inibidores seletivos da recaptção da serotonina (MUCK-SELER *et al*, 2002). Já a reserpina provoca a depleção dos neurotransmissores noradrenalina e serotonina, causando uma exacerbação da depressão (YAMASHITA *et al*, 1998).

Os resultados indicam que LCNa pode agir pelo bloqueio da recaptção de serotonina e noradrenalina, e com base no tempo de imobilidade dos camundongos tratados com a associação de LCNa e reserpina pode-se sugerir que a formulação pode promover o aumento da síntese ou liberação de noradrenalina e serotonina.

## CONCLUSÃO

A redução do tempo de imobilidade dos animais tratados com LCNa demonstra um possível efeito antidepressivo da formulação. Além disso, os resultados do teste do

nado forçado dos animais tratados com associações de LCNa com imipramina, paroxetina e reserpina sugerem que o efeito da formulação possa ser causado por um possível bloqueio na recaptção da noradrenalina e serotonina.

**REFERÊNCIAS**

DEL PORTO, José Alberto. Conceito e diagnóstico. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 21, p. 6-11, 1999.

FRYE, M.A.; PAZZAGLIA, P.J.; GEORGE, M.S.; LUCKENBAUGH, D.A.; VANDERHAM, E.; DAVIS, C.L.; RUBINOW, D.R.; POST, R.M. Low CSF somatostatin associated with response to nimodipine in patients with affective illness. **Biological Psychiatry**, v. 53, p. 180-183, 2003.

GRUNZE, H.; WALDEN, J.; WOLF, R.; BERGER, M. Combined treatment with lithium and nimodipina in a bipolar i manic syndrome. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 20, p 419-426, 1996.

KAROLEWICZ, B.; PAUL, I.A. Group housing of mice increases immobility and antidepressant sensitivity in the forced swim and tail suspension tests. **European Journal of Pharmacology**, v. 415, p. 197-201, 2001.

KATAGIR, H.; KAGAYA, A.; NAKAE, S.; MORINOBU, S.; YAMAWAKI, S. Modulation of serotonin<sub>2a</sub> receptor function in rats after repeated treatment with dexamethasone and L-type calcium channel antagonist nimodipina. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 25, p. 1269-1281, 2001

LAOUINIA, A.; JAAFAR-MAALEJA, C.; SFAR, S.; CHARCOSSETA, C.; FESSI, H. Liposome preparation using a hollow fiber membrane contactor — Application to spironolactone encapsulation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 415, p. 53-61, 2001.

LIMA, E.M. **Lipossomas: Estrutura, propriedades, aplicações**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade de São Paulo. São Paulo, 1995

MUCK-SELER, D.; PIVAC, N.; SAGUD, M.; JAKOVLJEVIĆ, M.; MIHALJEVIĆ-PELES, A. The effects of paroxetine and tianeptine on peripheral biochemical markers in major depression. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 26, p. 1235– 1243, 2002.

PORSOLT, R.D.; BERTIN, A.; JALFRE, M. Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants. **Arch. Into Pharmacodynamic Therapy**, v. 229, p. 327-336, 1977.

SANTOS, Hercília Maria L. R. **Lipossomas convencionais e sítio-específicos (Lectina-conjugada) contendo antineoplásicos**. Tese (Doutorado em ciências biológicas) Universidade Federal de Pernambuco. Recife, 2005.

SILVA, M.I.G. **Investigação dos efeitos centrais e gastroprotetores do isopulegol em camundongos**. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) Universidade Federal do Ceará. Fortaleza, 2009.

SKALISZ, L.L.; BEJAMINI, V.; JOCA, S.L.; VITAL, M. A.B.F.; DA CUNHA, C.; ANDREATINI, R. Evaluation of the face validity of reserpine administration as an animal model of depression–Parkinson’s disease association. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v.26, p. 879– 883, 2002.

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

VAN AMERONGEN, A.P.; FERREY, G.; TOURNOUX, A. A randomised, double-blind comparison of milnacipran and imipramine in the treatment of depression. **Journal of Affective Disorders**, v. 72, p. 21-31, 2002

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

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

YAMASHITA, K.; KITAYAMA, I.; HAMANAKA, K.; NOMURA, J. Effect of reserpine on 3-methoxy-4-hydroxyphenylethyleneglycol and 3,4-dihydroxyphenylacetic acid in the hippocampus of depression-model rats: An in vivo microdialysis study. **Brain Research**, v.785, p. 10–17, 1998

YU J.; HE H.B.; TANG X. Formulation and evaluation of nimodipine-loaded lipid microspheres. **Journal of Pharmacy and Parmacology**, v. 58, p. 1429-1435, 2006.

ZANINI, Antônio Carlos; OGA, Seizi. **Guia de medicamentos - uso racional de medicamentos**. Editora Atheneu, São Paulo, 1995.

**Estudos da atividade anticonvulsivante de uma formulação lipossomal contendo  
nimodipina (LCNa)**

**<sup>1</sup>MORENO, LCGAI; <sup>2</sup>CAVALCANTI, IMF; <sup>2</sup>SANTOS-MAGALHÃES, NS;  
<sup>1</sup>FREITAS, RM; <sup>1</sup>SANTOS, HMLR**

<sup>1</sup>Laboratório de Pesquisa em Neuroquímica Experimental do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Piauí. Campus Ministro Petrônio Portela, 64.049-550, Teresina – PI, Brasil.

<sup>2</sup>Laboratório de Imunopatologia Keizo-Asami da Universidade Federal de Pernambuco. Av. Prof. Moraes Rego, s/n, Cidade Universitária, 50670-901, Recife-PE, Brasil.

## RESUMO

Epilepsia é uma doença crônica do sistema nervoso central que afeta mais de 50 milhões de pessoas no mundo. É caracterizada por crises recorrentes originadas por descargas excessivas dos neurônios cerebrais que resultam em alterações persistentes do funcionamento cerebral normal e do estado cognitivo. Sabe-se que o aumento nas concentrações de cálcio intracelular apresenta um importante papel na atividade epileptiforme e que, por isso, antagonistas dos canais de cálcio constituem um alvo para o desenvolvimento de formulações antiepilépticas e neuroprotetoras. Nesse contexto, algumas diidropiridinas, a exemplo da nimodipina, demonstraram atividade anticonvulsivante em vários experimentos *in vitro* e *in vivo* devido à inibição do fluxo cálcio através dos canais voltagem dependente presente nos neurônios. No entanto, a nimodipina apresenta baixa solubilidade aquosa e alto índice de metabolismo de primeira passagem hepático, o que reduz significativamente a sua biodisponibilidade. Para solucionar esse problema foi produzida uma formulação lipossomal contendo nimodipina (LCNa) e seu possível efeito anticonvulsivante foi testado no modelo de convulsão induzida por pilocarpina. Camundongos *Swiss* adultos machos de 2 meses de idade, pesando de 25 a 30 g foram divididos em oito grupos de 20 animais cada. O grupo controle foi tratado com salina 0,9% (i.p.). O grupo P400 foi tratado com pilocarpina (400 mg/kg, i.p.). O terceiro, quarto e quinto grupos foram tratados com LCNa nas doses de 0,1, 1 e 10 mg/kg i.p., respectivamente e após 30 minutos receberam a mesma dose de pilocarpina do grupo P400 para a indução de crises convulsivas. Por fim, os animais do sexto, sétimo e oitavo grupos receberam apenas LCNa nas doses de 0,1, 1 e 10 mg/kg ip. Os animais de todos os grupos foram observados durante 24 horas após o tratamento para a determinação da presença de Sinais Colinérgicos Periféricos (SCP), Movimentos Estereotipados (ME), Tremores (T), Crises Convulsivas (CC), Estado de Mal Epiléptico (EME) e Taxa de Mortalidades (TM), bem como foram determinadas a Latência para Instalação da Primeira Convulsão (LIPC) e a Latência para Instalação do Mal Epiléptico (LIEME). Após esse período de observação, os animais foram eutanasiados. Os resultados demonstraram que a administração de LCNa nas doses de 0,1, 1 e 10 mg/kg apresentou efeito anticonvulsivante no modelo de convulsão induzido por pilocarpina, uma vez que reduziu o número de animais com tremores e impediu as crises convulsivas e o estado de mal epiléptico.

**Palavras-chave:** efeito anticonvulsivante, lipossomas, nimodipina.

## ABSTRACT

Epilepsy is a chronic disease of the central nervous system that affects more than 50 million people worldwide. It is characterized by recurrent seizures caused by excessive discharge of neurons in the brain result in persistent alterations of normal brain functioning and cognitive status. It is known that increased concentrations of intracellular calcium plays an important role in the epileptiform activity and, therefore, calcium channel antagonists are a target for the development of antiepileptic and neuroprotective formulations. In this context, some dihydropyridines, such as the nimodipine showed anticonvulsant activity in several experiments in vitro and in vivo due to inhibition of calcium flux through voltage-dependent channels present in neurons. However, nimodipine has low aqueous solubility and high rate of first pass liver metabolism, which significantly reduces its bioavailability. To solve this problem was made a liposomal formulation containing nimodipine (LCNa) and its possible anticonvulsant effect was tested in the model of seizures induced by pilocarpine. Adult male Swiss mice 2 months old, weighing 25-30 g were divided into eight groups of 20 animals each. The control group was treated with 0.9% saline (ip). The P400 group was treated with pilocarpine (400 mg / kg, ip). The third, fourth and fifth groups were treated with LCNa at doses of 0.1, 1 and 10 mg / kg ip, respectively and after 30 minutes received the same dose of pilocarpine group P400 to induce seizures. Finally, animals in the sixth, seventh and eighth groups received only LCNa at doses of 0.1, 1 and 10 mg / kg ip. Animals of all groups were observed for 24 hours after treatment to determine the presence of Cholinergic Signs Peripherals (SCP), Stereotyped Movements (ME), Tremor (T), Seizures (DC) Status Epilepticus (EME ) and mortality (TM), and were determined at the onset time of the First Seizure (Lipca) and latency for installing Epilepticus (Liem). After this observation period, the animals were euthanized. The results showed that administration of LCNa at doses of 0.1, 1 and 10 mg / kg showed anticonvulsant effect in the model of seizures induced by pilocarpine, since reduced the number of animals with tremors and seizures and prevented the state epilepticus.

Keywords: anticonvulsant effect, liposomes, nimodipine.

## INTRODUÇÃO

A epilepsia é uma doença crônica do sistema nervoso central que afeta mais de 50 milhões de pessoas em todo o mundo. É caracterizada por crises recorrentes originadas por descargas excessivas dos neurônios cerebrais que resultam em alterações persistentes do funcionamento cerebral normal e do estado cognitivo (TREIMAN, 1995). Apesar dos grandes avanços que vêm sendo realizados na pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos, essa doença ainda constitui um importante problema de saúde pública, uma vez que aproximadamente um terço dos pacientes não responde aos esquemas terapêuticos atualmente adotados (BHUTADA, 2010). Além disso, apenas três quartos dos afetados têm acesso ao tratamento adequado em países em desenvolvimento, evidenciando que a busca por terapias eficazes e mais acessíveis é necessária (ADEYEMI *et al*, 2010).

Sabe-se que o aumento nas concentrações de cálcio intracelular apresenta um importante papel na atividade epileptiforme e que, por isso, antagonistas dos canais de cálcio constituem um alvo para o desenvolvimento de formulações antiepiléticas e neuroprotetoras (MIKATI *et al*, 2004). Nesse contexto, algumas diidropiridinas e outros bloqueadores dos canais de cálcio, demonstraram atividade anticonvulsivante em vários experimentos *in vitro* e *in vivo* devido à inibição do fluxo cálcio através dos canais voltagem dependente presente nos neurônios (ZAPATER *et al*, 1998). Uma das diidropiridinas que teve seu efeito anticonvulsivante melhor estudado foi a nimodipina. Todavia, apesar de apresentar bons resultados como agente anticonvulsivante e neuroprotetor, a aplicação terapêutica do fármaco é limitada devido a uma solubilidade aquosa reduzida e a um alto metabolismo de primeira passagem hepático, que resulta em uma diminuição da biodisponibilidade quando a molécula é administrada por via oral (FARMACOPÉIA PORTUGUESA, 2005).

Uma solução para esse problema é a utilização de carreadores farmacêuticos de escala nanométrica. O uso da nanotecnologia possibilita a proteção do medicamento contra a degradação extracelular, melhora a seletividade em relação ao alvo, reduz a frequência de administração e a duração do tratamento e melhora o perfil farmacocinético da molécula (SANTOS-MAGALHÃES *et al*, 2010). Além disso, a liberação controlada do fármaco aumenta a sua biodisponibilidade e diminui a sua toxicidade. Assim, foi produzida uma formulação lipossomal derivada de nimodipina e

seus efeitos anticonvulsivantes foram testados em camundongos submetidos ao modelo de convulsão induzido por pilocarpina.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Produção da formulação lipossomal contendo nimodipina (LCNa)**

Os lipossomas contendo nimodipina foram preparados usando o método da hidratação do filme lipídico (ANDRADE *et al*, 2004). Os lipossomas sem carga (LCNa) foram produzidos utilizando os lipídeos fosfatidilcolina de soja e colesterol (proporção de 8:2) e 0,010 g de nimodipina para a obtenção de uma formulação lipossomal com concentração lipídeos de 117,6 mM e concentração do fármaco de 1,0 mg/mL. Esses constituintes foram solubilizados em uma mistura de clorofórmio:metanol (3:1 v/v), sob agitação magnética. Os solventes foram removidos por evaporação a vácuo, utilizando o rotaevaporador por 60 min ( $37 \pm 1$  °C, 80 rpm), resultando em um filme lipídico. Este filme foi, então, hidratado com 10 mL de solução tampão fosfato pH 7,4 produzindo assim vesículas multilamelares grandes. A suspensão lipossomal foi então submetida à sonicação por sonda ultrassônica (Vibra Cell, BRANSON, EUA) a 200 W e 40 Hz para 300 s para a obtenção de lipossomas unilamelares pequenos.

### **Estudos da possível atividade anticonvulsivante de LCNa**

#### **Animais**

Foram utilizados camundongos *Swiss* machos com 2 meses de idade e com peso de 25 a 30 g, provenientes do Biotério Central do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Piauí. Os animais destinados ao experimento permaneceram nas dependências do Laboratório de Pesquisa em Neuroquímica Experimental, por sete dias, para a adequada aclimatação. As unidades experimentais receberam água e dieta (Labina<sup>®</sup>) *ad libitum* e foram mantidos sob condições controladas de iluminação (ciclo 12 h claro/escuro) e temperatura ( $25 \pm 2$  °C). Os protocolos experimentais e procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal do Piauí (CEEA / UFPI N° 014/11).

## **Convulsões induzidas por pilocarpina**

Camundongos foram divididos em oito grupos de 20 animais cada. O grupo controle foi tratado com salina 0,9% (i.p.). O grupo P400 foi tratado com pilocarpina (400 mg/kg, i.p.). O terceiro, quarto e quinto grupos foram tratados com LCNa nas doses de 0,1, 1 e 10 mg/kg i.p., respectivamente e após 30 minutos receberam a mesma dose de pilocarpina do grupo P400 para a indução de crises convulsivas. Por fim, os animais do sexto, sétimo e oitavo grupos receberam apenas LCNa nas doses de 0,1, 1 e 10 mg/kg (i.p.).

Os animais de todos os grupos foram observados durante 24 horas após o tratamento para a determinação da presença de Sinais Colinérgicos Periféricos (SCP), Movimentos Estereotipados (ME), Tremores (T), Crises Convulsivas (CC), Estado de Mal Epilético (EME) e Taxa de Mortalidades (TM), bem como foram determinadas a Latência para Instalação da Primeira Convulsão (LIPC) e a Latência para Instalação do Mal Epilético (LIEME). Após esse período de observação os animais foram eutanasiados.

### **Análises estatísticas**

Os valores foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (E.P.M.) do número de animais usados nos experimentos. As diferenças entre os grupos foram determinadas por meio da Análise de Variância (ANOVA), seguida, quando detectada diferença, pelo teste *t*-Student-Newman-Keuls com *post hoc* teste. O nível de significância para rejeição da hipótese de nulidade foi sempre  $\geq$  a 5 %.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Os camundongos do grupo controle, assim como os animais dos grupos LCNa 0,1, LCNa 1 e LCNa 10 não apresentaram alterações comportamentais (Tabela 1). Todos os camundongos do grupo P400 mostraram mudanças no comportamento características da atividade epilética (SCP, ME, T e CC) e vieram a óbito. Os animais tratados com LCNa nas concentrações de 0,1, 1 e 10 mg/kg 30 minutos antes da aplicação de pilocarpina apresentaram algumas alterações comportamentais típicas da atividade epilética (SCP, ME e T), mas nenhum apresentou crise convulsiva ou veio a óbito durante as 24 horas de observação que se sucederam à administração da pilocarpina. Esses dados sugerem uma atividade anticonvulsivante da formulação, uma

vez que sua administração reduziu o número de animais com movimentos estereotipados e tremores e impediu as crises convulsivas e o estado de mal epiléptico de forma inversamente proporcional à dose, indicando um possível efeito dose dependente.

**Tabela 1:** Efeito agudo de LCNa em parâmetros comportamentais de camundongos adultos no modelo de convulsão induzida por pilocarpina.

GRUPOS	SCP	ME	T	CC	EME	TM
	%	%	%	%	%	%
Controle	00	00	00	00	00	00
P400	100	100	100	100	90	100
LCNa 0,1 + P400	100	65 <sup>b</sup>	100	00 <sup>b</sup>	00 <sup>b</sup>	00
LCNa 1 + P400	100	42,8 <sup>b,c</sup>	60 <sup>b,c</sup>	00 <sup>b</sup>	00 <sup>b</sup>	00
LCNa 10 + P400	100	30 <sup>b,c,d</sup>	20 <sup>b,c,d</sup>	00 <sup>b</sup>	00 <sup>b</sup>	00
LCNa 0,1	00	00	00	00	00	00
LCNa 1	00	00	00	00	00	00
LCNa 10	00	00	00	00	00	00

Os valores são a média  $\pm$  S.E.M. dos sinais coninérgicos periféricos, movimentos estereotipados, tremores, crises convulsivas, estado de mal epiléptico e taxa de mortalidade de 20 camundongos (por grupo) utilizados nos experimentos. <sup>b</sup>p<0.005 (ANOVA seguido de teste *t*-Student-Newman-Keuls com *post hoc* teste), significativamente diferente do grupo P400. <sup>c</sup>p<0.05 (ANOVA seguido de teste *t*-Student-Newman-Keuls com *post hoc* teste), significativamente diferente do grupo LCNa 0,1 + P400. <sup>d</sup>p<0.05 (ANOVA seguido de teste *t*-Student-Newman-Keuls com *post hoc* teste), significativamente diferente do grupo LCNa 1 + P400.

A fisiopatologia dos processos convulsivos ainda precisa ser bastante estudada para que se promova a sua elucidação, contudo sabe-se que a atividade convulsiva, quando mantida por tempo suficiente, induz a morte neuronal. O exato mecanismo de lesão cerebral não foi plenamente compreendido, mas comprovou-se que as convulsões podem desencadear uma variedade de processos bioquímicos que incluem um influxo de cálcio extracelular através dos canais L e N voltagem dependentes,

sensíveis aos receptores NMDA e não-NMDA, que provoca e ativação de fosfolipases, proteases e nucleases e causam a degradação de fosfolipídios de membrana, além de proteólise e fosforilação de proteínas do citoesqueleto. Alterações significativas do metabolismo dos fosfolipídeos das membranas celulares podem ocasionar a liberação de ácidos graxos livres, diacilgliceróis, eicosanóides, peróxidos lipídicos e radicais livres, o que pode alterar a fluidez da membrana celular e apresentar efeitos sobre a função de canais iônicos, transportadores e outras proteínas associadas à membrana. A presença de metabólitos lipídicos juntamente com a alteração da homeostase de íons podem estar envolvidos nos processos de lesão e morte celular (ZUPAN *et al*, 1999).

Então pode-se afirmar que a atividade epileptiforme intrínseca está relacionada ao influxo de cálcio através dos receptores N-metil-d-aspartato (NMDA) e dos canais de cálcio voltagem dependente e que, por isso, a inibição do aumento intracelular do íon constitui um importante alvo para o desenvolvimento de formulações antiepilépticas e neuroprotetoras (MIKATI *et al*, 2004). Além disso, pesquisas sugerem que mecanismos excitotóxicos mediados por receptores NMDA e não-NMDA, que promovem a abertura dos canais iônicos permeáveis ao cálcio, podem desempenhar um papel importante no desenvolvimento de lesão neuronal após convulsões induzida por altas doses de pilocarpina e associações de lítio e pilocarpina, confirmando a relevância do bloqueio dos canais de cálcio no produção de medidas neuroprotetoras (MARINHO *et al*, 1997). Em resumo, temos que a ativação dos receptores NMDA e não-NMDA ocasiona a abertura dos canais de cálcio, gerando uma entrada excessiva desses íons nos neurônios, o que leva a um processo chamado excitotoxicidade que causa a morte celular por necrose e apoptose. Assim, o bloqueio dos canais de cálcio diminui a ocorrência dos mecanismos excitotóxicos, reduzindo a morte celular dos neurônios.

Os diversos modelos de convulsão em animais são bastante utilizados para simular essa fisiopatologia dos processos convulsivos, uma vez que mimetizam as alterações comportamentais e eletroencefalográficas da epilepsia do lobo temporal de humanos (BEN-ARI; TREMBLAY; OTTERSEN, 1980). Assim, camundongos administrados com altas doses de pilocarpina, lítio ou associações de lítio com pilocarpina mostram um exacerbação de sinais colinérgicos periféricos, que induz a tremores, convulsões e lesões cerebrais, de forma semelhante ao que acontece com os humanos com epilepsia (MARINHO *et al*, 1998). De forma semelhante, a aplicação do broncodilatador aminofilina apresentou efeitos convulsivantes e proconvulsivantes em

ratos e camundongos (CHAKRABARTI; KAUR SAINI; GARG, 1998). Deste modo, a aplicação desses modelos possibilita a pesquisa de novos agentes anticonvulsivantes e neuroprotetores.

A nimodipina é um antagonista seletivo dos canais de cálcio tipo L que apresenta lipofilicidade elevada e por isso atravessa facilmente a barreira hematoencefálica, atingindo o Sistema Nervoso Central (SNC). O fármaco apresenta aplicabilidade na terapia de hemorragia subaracnóidea, é eficaz no tratamento do transtorno do humor, mostra efeitos no aumento da capacidade cognitiva de indivíduos com demência (FRYE *et al*, 2003), é usada na terapia de espasmos cerebrais, derrames, enxaquecas (WANG *et al*, 2006; YU; HE; TANG 2006) e no auxílio à recuperação de pacientes com traumatismo craniano (ASLAN *et al*, 2009) .

A nimodipina demonstrou propriedades antiepilépticas e neuroprotetoras no modelo de convulsão induzida por aminofilina (CHAKRABARTI; KAUR SAINI; GARG, 1998). Além disso, pesquisas realizadas anteriormente por nosso grupo indicaram que o pré-tratamento com essa diidropiridina nas doses de 10 e 30 mg/kg prolonga as latências de convulsões e o tempo para a morte dos animais no modelo de convulsão induzida por pilocarpina. No entanto, a administração do fármaco não foi capaz de impedir completamente a ocorrência das convulsões e a morte dos animais (NASCIMENTO, 2005). Provavelmente isso se deve à baixa biodisponibilidade do fármaco (ZANINI; OGA 1995). Esses inconvenientes foram revertidos pelo encapsulação da nimodipina em lipossomas, que teve finalidade de aumentar a biodisponibilidade e reduzir a toxicidade da molécula em questão, além de proporcionar a proteção e melhorar a solubilidade do fármaco.

## **CONCLUSÃO**

A formulação lipossomal contendo nimodipina (LCNa) apresentou atividade anticonvulsivante no modelo de convulsão induzido por pilocarpina.

## REFERÊNCIAS

ADEYEMI, O.O.; AKINDELE, A.J.; YEMITAN, O.K.; AIGIBE, F.R.; FAGBO, F.I. Anticonvulsant, anxiolytic and sedative activities of the aqueous root extract of *Securidaca longepedunculata* Fresen. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 130, p. 191–195, 2010.

ASLAN A.; GURELIK M.; CEMEK M.; GOKSEL H. M.; BUYUKOKUROGLU, M. E. Nimodipine can improve cerebral metabolism and outcome in patients with severe head trauma. **Pharmacological Research**, v. 59, p. 120–124, 2009.

BEN-ARI, Y.; TREMBLAY, E.; OTTERSEN, O.P. Injections of kainic acid into the amygdaloid complex of the rat: an electrographic, clinical and histological study in relation to the pathology of epilepsy. **Neuroscience**, v. 5, p. 515-528, 1980.

BHUTADA, P.; MUNDHADA, Y.; BANSOD , K.; DIXIT, P.; UMATHE, S.; MUNDHADA, D. Anticonvulsant activity of berberine, an isoquinoline alkaloid in mice. **Epilepsy & Behavior**, v. 18, p. 207–210, 2010.

CHAKRABARTI, A.; KAUR SAINI, H.; GARG, S.K. Dose-finding study with nimodipine: a selective central nervous system calcium channel blocker on aminophylline induced seizure model in rats. **Brain Research Bulletin**, v.45 p.495–499, 1998

Farmacopéia Portuguesa. 8a. Edição. Lisboa: Imprensa Nacional, 2005.

FRYE, M.A.; PAZZAGLIA, P.J.; GEORGE, M.S.; LUCKENBAUGH, D.A.; VANDERHAM, E.; DAVIS, C.L.; RUBINOW, D.R.; POST, R.M. Low CSF somatostatin associated with response to nimodipine in patients with affective illness. **Biological Psychiatry**, v. 53, p. 180-183, 2003.

MARINHO, M.M.F.; BRUIN, V.M.S.; SOUZA, F.C.F.; AGUIAR, L.M.V.; PINHO, R.S.N.; VIANA, G.B.S. Inhibitory action of a calcium channel blocker (nimodipine) on seizures and brain damage induced by pilocarpina and lithium-pilocarpine in rats. **Neuroscience Letters**, v.235, p.13-16, 1997

MARINHO, M.M.F.; SOUSA, F.C.F.; BRUIN, V.M.S.; VALE, M.R.; VIANA, G.S.B. Effects of lithium, alone or associated with pilocarpine, on muscarinic and dopaminergic receptors and on phosphoinositide metabolism in rat hippocampus and striatum. **Neurochemistry International**, v. 33, p. 299-306, 1998.

MIKATI, M.A.; HOLMES, G.L.; WERNER, S.; BAKKAR, N.; CARMANT, L.; LIU, Z.; STAFSTROM, C.E. Effects of nimodipine on the behavioral sequelae of experimental status epilepticus in prepubescent rats. **Epilepsy & Behavior**, v. 5, p. 168–174, 2004

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

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

TREIMAN, D.M. Electroclinical features of status epilepticus. **Journal Clinical Neurophysiology**, v.12, p. 343– 362, 1995.

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

YU J.; HE H.B.; TANG X. Formulation and evaluation of nimodipine-loaded lipid microspheres. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 58, p. 1429-1435, 2006.

ZANINI, A.C.; OGA, S. **Guia de medicamentos - uso racional de medicamentos**. Editora Atheneu, São Paulo, 1995.

ZAPATER, P.; JAVALOY, J.; ROMÁN, J.F.; VIDAL, M.T.; HORGA, J.F. Anticonvulsant effects of nimodipine and two novel dihydropyridines (PCA 50922 and PCA 50941) against seizures elicited by pentylentetrazole and electroconvulsive shock in mice. **Brain Research**, v. 796, p. 311-314, 1998.

ZUPAN, G.; ERAKOVI, V.; SIMONIC, A.; KRIZ, J.; VARLJEN, J. The influence of nimodipine, nicardipine and amlodipine on the brain free fatty acid level in rats with penicillin-induced seizures. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v.23, p. 952-961, 1999.

## CONCLUSÕES

LCN contem lipossomas unilamelares pequenos (SUV), com tamanho, homogeneidade e carga de superfície adequados, além de alto teor de fármaco encapsulado. A formulação não demonstrou toxicidade em camundongos e apresentou efeito ansiolítico, antidepressivo e anticonvulsivante nos modelos experimentais testados.

**REFERÊNCIAS**

ADEYEMI, O.O.; AKINDELE, A.J.; YEMITAN, O.K.; AIGIBE, F.R.; FAGBO, F.I. Anticonvulsant, anxiolytic and sedative activities of the aqueous root extract of *Securidaca longepedunculata* Fresen. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 130, p. 191–195, 2010.

ANDRADE, L.H.S.G.; GORESTREIN, C. Aspectos gerais das escalas de avaliação de ansiedade. **Revista de Psiquiatria Clínica**, v. 25, n. 6, p. 285-290, 1998.

ANDREATINI, R.; BOERNGEN-LACERDA, R.; FILHO ZOERTTO, D. Tratamento farmacológico do transtorno de ansiedade generalizada: perspectivas futuras. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 23, p.233-242, 2001.

ASLAN A.; GURELIK M.; CEMEK M.; GOKSEL H. M.; BUYUKOKUROGLU, M. E. Nimodipine can improve cerebral metabolism and outcome in patients with severe head trauma. **Pharmacological Research**, v. 59, p. 120–124, 2009.

BATISTA, C.M.; DE CARVALHO C.M.B.; SANTOS-MAGALHÃES, N.S. Lipossomas e suas aplicações terapêuticas: Estado da arte. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 43, p. 167- 179, 2007.

BERNE, R.M., LEVY, E., **Fisiologia**. 5<sup>a</sup> Edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

BHUTADA, P.; MUNDHADA, Y.; BANSOD , K.; DIXIT, P.; UMATHE, S.; MUNDHADA, D. Anticonvulsant activity of berberine, an isoquinoline alkaloid in mice. **Epilepsy & Behavior**, v. 18, p. 207–210, 2010.

CAVALCANTI, I.M.F.; MENDONÇA, E.A.M.; LIRA, M;C.B.; HONORATO, S.B.; CAMARA, C.A.; AMORIM, R.V.S.; MENDES FILHO, J.; RABELLO, M.M; HERNANDES, M.Z.; AYALA, A.P.; SANTOS-MAGALHÃES, N.S. The encapsulation of b-lapachone in 2-hydroxypropyl-b-cyclodextrin inclusion complex into liposomes: A physicochemical evaluation and molecular modeling approach. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, 2011- In press.

COUTINHO, M.P.L.; GONTIÉS, B.; ARAÚJO, L.F.; SÁ, R.C.N. Depressão, um sofrimento sem fronteira: representações sociais entre crianças e idosos. **Revista de Psicologia-USF**, v. 8, p. 183-192, 2003.

DEL PORTO, José Alberto. Conceito e diagnóstico. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v.21, p. 6-11, 1999.

Farmacopéia Portuguesa. 8<sup>a</sup> Edição. Lisboa: Imprensa Nacional, 2005.

FRÉZARD, F.; MICHALICK, M.S.M.; SOARES, C.F.; DEMICHELI, C. Novel methods for the encapsulation of meglumine antimoniate into liposomes. **Brasilian Journal of Medical and Biological Research**. v. 33, p. 841-846, 2000.

FONTINELLE, L. Neurobiologia na adolescência. **Jornal de Pediatria**, v.77, p. 205-216, 2001.

GOODMAN, L.S; GILMAN, A. **As bases Farmacológicas da Terapêutica**. 11<sup>a</sup> Edição. Editora Mac Graw Hill, 2006.

GRUNZE, H.; WALDEN, J.; WOLF, R; BERGER, M. Combined treatment with lithium and nimodipina in a bipolar i manic syndrome. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**. v. 20, p 419-426, 1996.

GUYTON, A.C., HALL, J.E **Tratado De Fisiologia Médica**. 10<sup>a</sup> Edição. Editora Guanabara Koogan, 2002.

HAN, H.; MA, Y.; EUN, J.E.; LI, R.; HONG, J.; LEE, M.; OH, K., Anxiolytic-like effects of sanjoinine A isolated from Zizyphi Spinosi Semen: Possible involvement of GABAergic transmission. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 92, p. 206–213, 2009.

HURKO, O. Future drug discovery and development. **Molecular Genetics and Metabolism**. v. 100, p. 292-296, 2010.

KABUT, H.; YOKOI, I.; MORI, A.; MURAKAMIB, M.; SAWADA, S. Neurocheqical changes related to ageing in the senescence-accelerated mouse brain and the effect of

chronic administration of nimodipina. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 80, p. 1-9, 1995

KATAGIR, H.; KAGAYA, A.; NAKAE, S.; MORINOBU, S.; YAMAWAKI S. Modulation of serotonin<sub>2a</sub> receptor function in rats after repeated treatment with dexamethasone and L-type calcium channel antagonist nimodipina. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**. v. 25, p. 1269-1281, 2001.

LIMA, E.M. **Lipossomas: Estrutura, propriedades, aplicações**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade de São Paulo. São Paulo, 1995.

LOSCHER, W. New visions in the pharmacology of anticonvulsion. **European Journal of Pharmacology**, v. 342, p. 1-13, 1998.

MACHADO, L.C.; GNOATTO, S.A.; KLÜPPEL, M.L.W.; LIPOSSOMAS APLICADOS EM FARMACOLOGIA: Uma revisão da literatura. **Estudos de Biologia**. v. 29, p. 215-224, 2004.

MELDRUM, B. S.; AKBAR, M. T.; CHAPMAN, A. G. Glutamate receptors and transporters in genetic and acquired models of epilepsy. **Epilepsy Research**. v. 36, p. 189-204, 1999.

MIKATI, M.A.; HOLMES, G.L.; WERNER, S.; BAKKAR, N.; CARMANT, L.; LIU, Z.; STAFSTROM, C.E . Effects of nimodipine on the behavioral sequelae of experimental status epilepticus in prepubescent rats. **Epilepsy & Behavior**, v. 5, p. 168–174, 2004

NARDI, A.E. Comentários do debatedor: escalas de avaliação de ansiedade. **Revista de Psiquiatria Clínica**. v. 25, n. 6, p. 331-333, 1998.

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

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

RIBEIRO, R.R.; MOURA, E.P.; PIMENTEL, V.M. Reduced tissue parasitic load infectivity to sand flies in dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi* following treatment with a liposome formulation of meglumine antimoniate. **Antimicrobial agents and chemotherapy**. v. 52, p. 2564–2572, 2008.

SANTOS, Hercília Maria L. R. **Lipossomas convencionais e sítio-específicos (Lectina-conjugada) contendo antineoplásicos**. Tese (Doutorado em ciências biológicas) Universidade Federal de Pernambuco. Recife, 2005.

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

SEO, J.; LEE, S.; LEE, J.; KWON, B.; MA, Y.; HWANG, B.; HONG, J. OH, K. Anxiolytic-like effects of obovatol isolated from *Magnolia obovata*: Involvement of GABA/benzodiazepine receptors complex. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 31, p. 1363–1369, 2007.

SILVA, M.I.G.; AQUINO NETO, M.R.; TEIXEIRA NETO, P.F.; MOURA, B.A.; DO AMARAL J.F., DE SOUSA, D.P.; VASCONCELOS, S.M.M.; DE SOUSA, F.C.F. Central nervous system activity of acute administration of isopulegol in mice. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**. v. 88, p. 141–147, 2007.

SILVA, Penildon. *Farmacologia*. 7ª Edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.

SOUSA, Fábio Gomes de Matos e. Tratamento da depressão. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 21, p. 18-23,1999.

STELLA, F. Depressão no Idoso: Diagnóstico, Tratamento e Benefícios da Atividade Física. **Revista Motriz**, v. 18, p. 91-98, 2002.

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

YU J.; HE, H.B.; TANG, X. Formulation and evaluation of nimodipine-loaded lipid microspheres. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v. 58, p. 1429-1435, 2006.

ZANINI, A.C.; OGA, S. **Guia de medicamentos - uso racional de medicamentos**. Editora Atheneu, São Paulo, 1995.

ZOUHAR, A.; MARES, P.; LISKOVA-BERNASDOVA, K.; MUDROCHOVA, M.; Motor and electrocorticographic activity induced by bicuculline in developing rats. **Epilepsia**, v. 20, p. 501-510, 1989.

## APÊNDICES

### Trabalhos apresentados no 1º Workshop de Tecnologia Farmacêutica e Inovação:

#### DELINEAMENTO FARMACÊUTICO DE LIPOSSOMAS (LCN1 E LCN2)

Lina Clara G. A. I. Moreno<sup>1\*</sup>, Laísa Lis F. Sá<sup>2</sup>, Nereide S. S. Magalhães<sup>3</sup>, Rivelilson Freitas<sup>1,2</sup>, Hercília M. L. R. Santos<sup>1</sup> \* [clarinhamoreno87@hotmail.com](mailto:clarinhamoreno87@hotmail.com)

<sup>1</sup>Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas/UFPI, <sup>2</sup>Curso de Graduação em Farmácia/UFPI <sup>3</sup>Laboratório de Imunopatologia Keizo-Asami/UFPE.

Concentrações aumentadas de  $Ca^{++}$  citosólico provocam um aumento das contrações de células da musculatura lisa cardíaca e vascular. Nesse contexto, alguns fármacos atuam no bloqueio dos canais de  $Ca^{++}$ , provocando a diminuição dessas contrações. Um exemplo é o grupo das diidropiridinas, moléculas que devido a uma elevada lipofilicidade atravessam facilmente a barreira hematoencefálica, permanecendo no cérebro. Sabe-se que uma circulação cerebral mais efetiva ocasiona melhoras em inúmeras patologias. No entanto, para produzir efeitos benéficos, os vasodilatadores devem ser administrados em altas doses, o que provoca vários efeitos colaterais. Esses desconfortos podem ser minimizados pela utilização de carreadores farmacêuticos nanométricos. Com esse objetivo foram desenvolvidos lipossomas contendo um vasodilatador pertencente à classe das diidropiridinas. Foram produzidas 2 formulações utilizando os fosfolipídios fosfatidilcolina de soja, colesterol e estearilamina pelo método de formação do filme lipídico seguido de sonicação: uma com carga neutra - LCN1 e a outra com carga positiva - LCN2 (Anselem *et al.*, 1993). A caracterização foi efetuada através de técnicas específicas de controle de qualidade para determinação dos parâmetros físico-químicos. LCN1 apresentou tamanho de partícula de  $121,93 \pm 0,60$  nm, índice de polidispersão  $0,297 \pm 0,02$ , potencial zeta  $-5,32 \pm 1,29$ , pH 7,3, rendimento e taxa de encapsulação do fármaco de 100%. LCN2 apresentou tamanho de partícula  $153,47 \pm 1,88$  nm, índice de polidispersão  $0,313 \pm 0,02$ , potencial zeta  $+10,17 \pm 1,99$ , pH 7,4, teor de fármaco  $79,17 \pm 0,79\%$  e taxa de encapsulação de  $73,68 \pm 0,92\%$ . Os resultados indicam que as formulações contêm lipossomas unilamelares pequenos (SUV), com tamanho, homogeneidade e carga de superfície adequados para testes *in vivo*, além de alto teor de fármaco encapsulado, o que indica que o método de produção foi eficiente. LCN1 foi escolhida para testes em animais de laboratório, por

apresentar melhores resultados. Estas preparações mostram-se promissoras para a terapia de doenças do sistema nervoso central.

### ESTUDO DA TOXICIDADE DA FORMULAÇÃO LIPOSSOMAL DE DIIDROPIRIDINA (LCN1)

Lina Clara G. A. I. Moreno<sup>1\*</sup>, Pauline S. Santos<sup>2</sup>, Dayane A. Costa<sup>1</sup>, Eliamara B. Sabino<sup>1</sup>, Rivelilson M. Freitas<sup>1, 2</sup>, Hercília M. L. R. Santos<sup>1</sup>. \*[clarinhamoreno87@hotmail.com](mailto:clarinhamoreno87@hotmail.com)

<sup>1</sup>Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas/UFPI. <sup>2</sup>Curso de Graduação em Farmácia/UFPI.

Fármacos pertencentes à família das diidropiridinas atuam inibindo a entrada dos íons cálcio nas células da musculatura lisa e do músculo cardíaco, provocando vasodilatação. Por apresentarem elevada lipofilicidade, essas moléculas atravessam facilmente a barreira hematoencefálica e se concentram no cérebro. Estudos indicam que durante algumas fases da lesão cerebral o fluxo sanguíneo está diminuído e o consumo de oxigênio pode estar aumentado, o que prejudica o estado do paciente. Assim, o uso de vasodilatadores mostra-se útil no tratamento de patologias que acometem esse órgão. Todavia, para apresentarem resultados efetivos esses fármacos devem ser administrados em altas doses, ocasionando inúmeras reações adversas. Esse inconveniente pode ser reduzido pela utilização de lipossomas, que promovem a liberação controlada do medicamento. Nesse sentido, uma formulação lipossomal contendo diidropiridina (LCN1) teve a sua toxicidade aguda testada em camundongos *Swiss* adultos machos. A preparação foi aplicada via intraperitoneal em dose única de 0,1 mg de fármaco/kg de peso do animal. Após 30 minutos da aplicação foi realizado o teste do campo aberto para avaliação da atividade motora. Além disso, os animais pós-tratados foram observados durante 7 dias, verificando os seguintes parâmetros: consumo médio de ração/água, peso das excretas e ganho/perda de massa corpórea. No 8º dia foram realizados testes bioquímicos e hematológicos. Os animais do grupo experimental não apresentaram variação significativa no consumo de ração/água, peso das excretas ou massa corpórea quando comparados ao grupo controle. Os exames bioquímicos e hematológicos também não mostraram alterações. O teste do campo aberto mostrou compatibilidade com a normalidade. Os dados de *grooming*, *rearing* e *de crossing* foram de  $11,83 \pm 3,27$ ,  $14 \pm 2,92$  e  $71,83 \pm 3,47$ , respectivamente. O teste de *Screnning Hipocrático* mostrou ausência de alterações no estado de consciência, coordenação motora, tônus muscular, reflexos e atividades dos Sistemas (Nervoso Central e Autônomo). Esses resultados indicam que a LCN1 não apresentou toxicidade na dose testada em camundongos adultos.

**Trabalho apresentado na XXVI Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental – FESBE:**

**EVALUATION OF A LIPOSOME DIHYDROPYRIDINES (LCN) DERIVATIVE ON FORCED SWIMMING TEST**

Lina Clara G. A. I. Moreno<sup>1,\*</sup>, Jéssica P. Costa<sup>1</sup>, Dayane A. Costa<sup>1</sup>, Eliamara B. Sabino<sup>1</sup>, Nereide S. S. Magalhães<sup>2</sup>, Rivelilson M. Freitas<sup>1</sup>, Hercília M. L. R. Santos<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Postgraduation Program in Pharmaceutical Sciences/UFPI, <sup>2</sup>Immunopatology Keizo-Asami Laboratory/UFPE, Brazil.

**Aim:** Increasing concentrations of intracellular  $\text{Ca}^{++}$  cause contraction of vascular muscle cells and the heart. In this context, some drugs act by binding these channels in order to promote a competitive inhibition. Thus, the channel blockers of  $\text{Ca}^{++}$  act to reduce the excitability rate of the heart and promote vasodilation. An example of blockers is dihydropyridines group. These molecules have a high lipophilicity and readily cross the blood brain barrier, remaining in the brain. It is known that a more effective cerebral circulation leads to improvements in many diseases. However, in order to produce beneficial effects, these drugs should be administered at high doses, causing several side effects. These discomforts can be minimized by using liposomes, since they promote a controlled release of the drug, increasing its bioavailability and reducing its toxicity. The objective the present study was to develop a liposomal formulation containing a vasodilator belonging to dihydropyridines class as well as to evaluate its pharmacological potential on forced swimming test.

**Methods and Results:** The preparation, known as LCN, was produced by using soybean phosphatidylcholine lipids and cholesterol by the method of forming lipid film followed by sonication. The characterization was performed using specific techniques of quality control for determination of physicochemical parameters. LCN showed particle size of  $121.93 \pm 0.60$  nm, polydispersity  $0.297 \pm 0.02$ , zeta potential  $-5.32 \pm 1.29$ , pH 7.3, and yield rate drug content of 100%. After their characterization, the formulation was administered in three groups of seven adult male Swiss mice at doses of 0.1 (LCN 0.1), 1.0 (LCN 1) and 10 (LCN 10) mg/kg. A fourth group was given 0.9% saline solution (control group) and a fifth received imipramine at a dose of 50 mg / kg (positive control). After 30 min from administration, forced swimming test was performed and immobility time was determined in seconds. Mean immobility time to LCN 0.1, LCN 1 and LCN 10 were  $9.14 \pm 5.68$ ,  $7.57 \pm 3.66$  and  $1.0 \pm 0.72$ , respectively. The results indicate a possible antidepressant effect of the formulation, since the immobility time of the doses were significantly lower than the average of both control ( $224.3 \pm 0.86$ ) and imipramine-treated animals ( $75.00 \pm 0.68$ ), suggesting a possible blocking effect in the reuptake of norepinephrine and serotonin.

Conclusion: By the results of the study, we cannot conclude that LCN have antidepressant effect, but we can suggest an action on central nervous system and further investigations on LCN with associations of antidepressants already described in literature should be carried out.

Support: CNPq and CAPES for financial support.

**Trabalho apresentado no 8° Congresso Internacional de Ciências Farmacêuticas - CIFARP:**

**EVALUATION OF ANTICONVULSANT EFFECT OF LCN ON PILOCARPINE-INDUCED SEIZURES**

MORENO, L.C.G.A.I.<sup>1</sup>, MAGALHÃES, N.S.S.<sup>2</sup>, FREITAS, R.M.<sup>1</sup>, SANTOS, H.M.L.R.<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Postgraduated Program in Pharmaceutical Sciences/UFPI, <sup>2</sup>Immunopathology Keizo-Asami Laboratory/UFPE, Brazil.

Keywords: Liposome, Pilocarpine, Seizures.

**1. Introduction**

Increasing concentrations of intracellular Ca<sup>++</sup> elevation causes contraction of vascular muscle cells and heart. In this context, some drugs act by binding to these channels in order to promote a competitive inhibition. Thus, the channel blockers, Ca<sup>++</sup> act to reduce the neuronal excitability. An example of blocking is dihydropyridines group, this molecules has high lipophilicity readily cross the blood brain barrier, remaining in brain. It is known that a more effective cerebral circulation leads to improvements in many diseases. However, to produce beneficial effects, these drugs should be administered at high doses, causing several side effects. These discomforts can be minimized by use of liposomes, since they promote the controlled release of drug, increasing its bioavailability and reducing its toxicity. The aim of present study was to examine the effects of a drug of the dihydropyridines group (LCN) on anticonvulsant activity in adult mice prior to pilocarpine-induced seizures.

**2. Methods**

The preparation (LCN) was produced using soybean phosphatidylcholine lipids and cholesterol by method of forming lipid film followed by sonication. The characterization was performed using specific techniques of quality control for determination of physicochemical parameters.

Adult male Swiss mice (25-30g) were maintained in a temperature controlled room (26 ± 1°C) with a 12-h light/dark cycle and food and water *ad libitum*. A total of 96 mice were treated with either 0.1, 1 and 10 mg/kg LCN (i.p., LCN) or vehicle (saline/Tween 80 0.05%, i.p.), and 30 min later the treatments 24 mice from each above group were randomized to pilocarpine hydrochloride administration (400 mg/kg, i.p., P400). Thus there are 8 groups of mice (n=24) in this set of experiments: groups 1, 2 and 3: LCN (0.1, 1 and 10 mg/kg) and P400 co-administration; group 4, P400 plus vehicle treatment; group 5, 6 and 7, LCN (0.1, 1 and 10 mg/kg) alone administration; and group 8, vehicle treatment serves as control. After the treatments, the animals were recorded

in 30 cm x 30 cm chambers with: latency to first seizure (any one of the behavioral indices typically observed after pilocarpine administration: wild running, clonus, tonus, clonic-tonic seizures) and number of animals that died after pilocarpine administration. Previous work has shown that convulsions and deaths occurred within 1 and 24 h respectively post pilocarpine injection, so we decided to record the phenotypes of the animals for 24 h after P400 administration. The P400 group was constituted by those presented seizures and status epilepticus (SE). The drug dosages of pilocarpine and LCN were determined by previous study in our lab and the present study.

### **3. Results**

LCN showed particle size of  $121.93 \pm 0.60$  nm, polydispersity  $0.297 \pm 0.02$ , zeta potential  $-5.32 \pm 1.29$ , pH 7.3, and yield rate drug content of 100%. Pilocarpine induced the first seizure at  $10.50 \pm 0.94$  min. All the animals studied showed generalized tonic-clonic convulsions with SE, and 100% died after the seizures. All animals pretreated with LCN were observed for 24 h before pilocarpine injection and their manifested alterations in behavior, such as peripheral cholinergic signs (100%), tremors (60%), staring spells, facial automatisms, wet dog shakes and rearing (40%). However, no developed SE. LCN (0.1, 1 and 10 mg/kg) administration before pilocarpine treatment reduced by 100% the percentage of animals that seized and increased (100%) the survival rate ( $p < 0.05$ ), when compared to the pilocarpine only group. None of the control animals (vehicle or LCN) showed seizures.

In pharmacological behavioral screening, the animals treated with LCN showed increase of response to touches and increasing of motor activity. These data are indicative of stimulatory activity of the CNS.

### **4. Conclusion**

Our results suggest that the all dose tested LCN has anticonvulsant similar. However, no will get detect a dose-dependent, and more studies must be conducted to better clarify the mechanism of action of this LCN.

### **Acknowledgments**

The authors are grateful to CNPq and CAPES.



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

**DECLARAÇÃO**

Requerente: Lina Clara Gayoso e Almendra Ibiapina Moreno. CPF:023.174.063-80

Vínculo: Aluna do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da UFPI.

Título do Projeto: Uso e aplicações farmacêuticas da formulação lipossomal de nimodipina como ansiolítico anti-depressivo e anti-convulsivante.

Data de Entrada no NINTEC: 12/07/2011

O Núcleo de Inovação e Transferência de Tecnologia – NINTEC -, órgão à Universidade Federal do Piauí, através deste instrumento, declara para as finalidades de direito, a pedido do interessado, que se encontra em nosso poder solicitação para depósito de pedido de PATENTE de autoria do(a) Requerente supra nominado(a) e seu respectivo título, também cima descrito, o(a) qual está em fase de análise dos requisitos necessários à sua formalização junto ao INPI – Instituto Nacional de Propriedade Industrial.

Informamos ainda que para a consecução da postulação pretendida, o objeto deste pleito deve necessariamente atender às seguintes fases:

- a) pré-análise à patenteabilidade da criação;
- b) busca de anterioridade para verificação do estado da técnica;
- c) envio do resultado da busca de anterioridade, juntamente com cópias de pedido já requerido no Brasil e em outros países, bem como orientações para a redação do pedido de patente (AN 127/1997 – INPI);
- d) solicitação de pagamento das taxas de depósito e abertura de processo no Protocolo Geral para depósito de pedido;
- e) apreciação e assinatura da Reitoria da UFPI.
- f) encaminhamento da documentação ao INPI para depósito.

Salientamos ainda que, para cada fase acima descrita, é necessário tempo hábil para as respostas, a fim de cumprir com fidelidade e segurança a pretensão perquerida.

Por ser verdade, firmo a presente.

Teresina (PI), 25 de Outubro de 2011.

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Maria Rita de Moraes Chaves Santos  
 Coordenadora do Núcleo de Inovação e Transferência de Tecnologia da UFPI