



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

Avaliação do potencial antioxidante e mecanismo de ação ansiolítico de lipossomas contendo nimodipina: envolvimento dos sistemas serotoninérgico e dopaminérgico

HELLEN KELEN MARIA MEDEIROS COIMBRA VIANA

Teresina – Piauí
Novembro/2014

HELLEN KELEN MARIA MEDEIROS COIMBRA VIANA

Avaliação do potencial antioxidante e mecanismo de ação ansiolítico de lipossomas contendo nimodipina: envolvimento dos sistemas serotoninérgico e dopaminérgico

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

Orientadora: Profa. Dra. Hercília Maria Lins Rolim

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

Teresina – Piauí

Novembro/2014

FICHA CATALOGRÁFICA
Universidade Federal do Piauí
Biblioteca Comunitária Jornalista Carlos Castello Branco
Serviço de Processamento Técnico

V614a Viana, Hellen Kelen Maria Medeiros Coimbra.
Avaliação do potencial antioxidante e mecanismo de
ação ansiolítico de lipossomas contendo nimodipina :
envolvimento dos sistemas serotoninérgico e
dopaminérgico / Hellen Kelen Maria Medeiros Coimbra
Viana. – 2014.
94 f.

Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) –
Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2014.
“Orientação: Prof.ª. Dr.ª. Hercília Maria Lins Rolim”.
“Coorientação: Prof. Dr. Rivelilson Mendes de
Freitas”.

1. Ansiolítico. 2. Antioxidante. 3. Lipossomas.
4. Nimodipina. I. Título.

CDD 615.788 2

HELLEN KELEN MARIA MEDEIROS COIMBRA VIANA

Avaliação do potencial antioxidante e mecanismo de ação ansiolítico de lipossomas contendo nimodipina: envolvimento dos sistemas serotoninérgico e dopaminérgico

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

Aprovada em ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Hercília Maria Lins Rolim (Orientadora)

Departamento de Bioquímica e Farmacologia – UFPI

Profa. Dra. Aldeídia Pereira de Oliveira (Examinador interno)

Departamento de Biofísica e Fisiologia – UFPI

Prof. Dr. Waldecy de Lucca Júnior (Examinador externo)

Departamento de Morfologia – UFS

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ

REITOR

Prof. Dr. José de Arimatéia Dantas Lopes

VICE-REITOR

Profa. Dra. Nadir do Nascimento Nogueira

PRO-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Dr. Pedro Vilarinho castelo Branco

PRO-REITOR DE PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Dr. Helder Nunes da Cunha

DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Profa. Dra. Regina Ferraz Mendes

COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS

FARMACÊUTICAS

Prof. Dr. Paulo Michel Pinheiro Ferreira

VICE-COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS

FARMACÊUTICAS

Prof. Dr. Rivelilson Mendes de Freitas

DEDICATÓRIA

Dedico essa conquista:

À DEUS por ser companheiro fiel, provedor de todas as minhas necessidades, por me dar forças para seguir adiante, com saúde e perseverança para atingir os objetivos.

Ao meu esposo, pela compreensão e companheirismo desde o início.

Às minhas filhas pelo amor.

Aos meus pais pela educação.

Às minhas irmãs pelo apoio e carinho.

Aos meus orientadores, Professora Dra. Hercília Maria Lins Rolim e Prof.

Dr. Rivelilson Mendes de Freitas, pela orientação e disponibilidade.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à **DEUS** por todas as obras e graças na minha vida. Obrigada senhor!

Às minhas filhas, **Gabriela Medeiros e Maria Luiza Medeiros** razão de toda a minha luta. Que muitas vezes, sentiram a minha ausência, mas que sorriram para me confortar.

Ao meu esposo **Doriedon Viana dos Santos**, pelo companheirismo, paciência, amor e compreensão durante a jornada.

Aos meus pais **Luiz Francisco Lima Coimbra e Edelza Medeiros Coimbra** por todo esforço, dedicação e incentivos despendidos à minha educação e formação.

Às minhas irmãs, **Deylen Coimbra e Hémylen Coimbra** por acreditarem e incentivarem o meu trabalho.

Aos meus orientadores, **Dra. Hercília Maria Lins Rolim e Dr. Rivelilson Mendes de Freitas**, pela dedicação e orientação. Por compreenderem minhas limitações.

Aos professores do **PPGCF** pela dedicação.

Ao prof. **Dr. André Luiz Menezes** pela amizade e incentivo

Aos meus **amigos** de pós-graduação, pelo apoio e incentivo durante a jornada.

Aos meus companheiros do Laboratório de Pesquisa em Neuroquímica Experimental (LAPNEX), pela convivência e grande contribuição na pesquisa. Com destaque para **George Oliveira** por ter me auxiliado em várias as etapas.

Às alunas de Iniciação Científica **Viviane Almeida, Josileide Rodrigues e Shirlene Medeiros**, pelo carinho e apoio.

Aos meus companheiros de turma, com destaque para **Iluska Pinheiro**, amiga e companheira desde a graduação, **Jurandir, Katrícia, Marcela, Oskar e Rodrigo**.

Gratidão especial para amiga de longa jornada, **Cristina Lages** pela amizade, por me apoiar e incentivar desde o começo.

Aos colegas do **Lapgenic e Lapcom** pelo auxílio.

Aos **funcionários** do LAPNEX pelos cuidados.

À **Universidade Federal do Piauí** pela oportunidade.

Ao **CNPq** pelo incentivo à pesquisa.

Aos **membros da banca** por se disponibilizarem gentilmente para avaliação deste estudo.

*Não chores, meu filho;
Não chores, que a vida
É luta renhida:
Viver é lutar
A vida é um combate
Que os fracos abate,
Que os fortes, os bravos,
Só pode exaltar.*

Gonçalves Dias

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

LISTA DE TABELAS

RESUMO

ABSTRACT

1. INTRODUÇÃO	19
2. OBJETIVOS	21
2.1 Objetivo Geral.....	21
2.2 Objetivos Específicos.....	21
3. REVISÃO DE LITERATURA	22
3.1 Ansiedade.....	22
3.2 Diidropiridinas – Antagonistas dos canais de cálcio.....	22
3.3 Nimodipina.....	23
3.4 Lipossomas.....	24
3.5 Sistema serotoninérgico.....	25
3.6 Sistema dopaminérgico.....	26
3.7 Estresse oxidativo e lipossomas.....	27
Referências.....	27
4. CAPÍTULO I: Prospecção tecnológica de lipossomas para tratamento de doenças relacionadas com o sistema nervoso central	32
Resumo.....	33
Introdução.....	34
Metodologia.....	35
Resultados e Discussão.....	37
Conclusão.....	41
Referências.....	42
5. CAPÍTULO II: Avaliação da capacidade antioxidante <i>in vitro</i> de uma formulação lipossomal contendo nimodipina	44
Resumo.....	45
Introdução.....	46
Material e Métodos.....	47
Resultados.....	52

Discussão.....	57
Conclusão.....	60
Referências.....	60
6. CAPÍTULO III: Investigação do envolvimento do sistema serotoninérgico e dopaminérgico no mecanismo de ação ansiolítico de uma formulação farmacêutica lipossomal contendo nimodipina	63
Resumo.....	64
Introdução.....	65
Material e Métodos.....	67
Resultados e Discussão	72
Conclusão.....	85
Referências.....	85
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	91
ANEXOS	92

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

μg	Micrograma
5-HT	5 – hidroxitriptamina, serotonina
ABTS	Ácido 2,2'-azinobis-3 etilbenzotiazolina-6-sulfónico
ALE	Atividade locomotora espontânea
ANOVA	Análise de variância
BHE	Barreira hemato-encefálica
CE ₅₀	Concentração efetiva que promove 50% da resposta máxima
CIP	Classificação Internacional de Patentes
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
D ₁	Receptores dopaminérgicos tipo 1
D ₂	Receptores dopaminérgicos tipo 2
DA	Doença de Alzheimer
DOPA	Dopamina
DP	Doença de Parkinson
DPPH	2,2 difenil-2-picrilhidrazila
E.P.M	Erro padrão da média
EPO	<i>European Patent Office</i>
Fe ³⁺	Ferricianeto de potássio
FDA	<i>Food and drug organization</i>
Fe ²⁺	Ferrocianeto de potássio
GABA	Ácido gama-aminobutírico
HO•	Radical hidroxila
i.p	Via intra-peritoneal
INPI	Instituto Nacional de Propriedade Intelectual
LCE	Labirinto em cruz elevado
LCNa	Lipossomas contendo nimodipina
L-DOPA	L – dopamina
NEBA	Número de entradas nos braços abertos
NMD	Nimodipina
NO ₂ •	Íon nitrito
O ₂ ⁻	Radical superóxido

RL	Radicais livres
SNC	Sistema nervoso central
SULP	Sulpirida
TCP	Tratado de cooperação de patentes
TPBA	Tempo de permanência nos braços abertos
USPTO	<i>United States Patent and Trademark Office</i>
v.o.	Via oral
WHO	<i>World Health Organization</i>
WIPO	<i>World Intellectual Property Organization</i>

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

INTRODUÇÃO

Ilustração 1	Representação estrutural da dissertação	20
---------------------	---	----

REVISÃO DE LITERATURA

Ilustração 1	Estrutura Química da Nimodipina	24
---------------------	---------------------------------------	----

CAPÍTULO I

Ilustração 1	Esquematização da realização da busca de patentes	36
---------------------	---	----

Ilustração 2	Números de depósitos de patentes utilizando os termos em estudo durante os anos de 1984 e 2014	38
---------------------	--	----

Ilustração 3	Total de depósitos de patentes pesquisados nas bases do INPI, EPO, WIPO, USPTO utilizando os termos de busca “lipossoma” e “lipossoma e doenças do sistema nervoso central”	39
---------------------	---	----

Ilustração 4	Total de depósitos de patentes pesquisados nas bases da EPO, WIPO, USPTO e INPI (a) e sua relação com os países e organizações depositantes (b), Estados Unidos (US), Organização Mundial de Propriedade Intelectual (WO) e Organização Europeia de Patentes (EPO)	40
---------------------	--	----

Ilustração 5	Patentes depositadas no EPO, WIPO, USPTO e INPI por código de classificação internacional	41
---------------------	---	----

CAPÍTULO II

Ilustração 1	Avaliação da capacidade antioxidante do LCNa e da nimodipina pelo método DPPH.....	48
---------------------	--	----

Ilustração 2	Avaliação da capacidade antioxidante do LCNa e da nimodipina pelo método ABTS.....	50
---------------------	--	----

Ilustração 3	Avaliação da capacidade antioxidante do LCNa e da nimodipina pelo radical superóxido.....	51
---------------------	---	----

Ilustração 4	Avaliação do potencial redutor do LCNa e da nimodipina.....	52
---------------------	---	----

Ilustração 5	Efeitos do LCNa e da nimodipina na inibição do radical DPPH. .	53
---------------------	--	----

Ilustração 6	Efeitos do LCNa e da nimodipina na inibição do radical ABTS•+	54
Ilustração 7	Efeitos do LCNa e da nimodipina na inibição do radical superóxido	56
Ilustração 8	Potencial redutor (Fe ³⁺ /Fe ²⁺) do LCNa e da nimodipina	57
Ilustração 9	Possíveis mecanismos da ação antioxidante da nimodipina na neutralização do radical R• (DPPH•, ABTS•+, SO ₂ •-)	60

CAPÍTULO III

Ilustração 1	Experimento claro/escuro	69
Ilustração 2	Experimento Labirinto em cruz elevado	70
Ilustração 3	Experimento Campo Aberto.....	71
Ilustração 4	Experimento <i>Rota-rod</i>	71

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

Tabela 1	Número de depósitos de patentes por base de dados envolvendo os diferentes termos utilizados	37
-----------------	--	----

CAPÍTULO III

Tabela 1	Efeitos da nimodipina, formulação lipossomal contendo nimodipina (LCNa), buspirona, WAY100635 e suas associações em camundongos no teste do claro/escuro.....	74
Tabela 2	Efeitos da nimodipina, formulação lipossomal contendo nimodipina (LCNa), dopamina, sulpirida suas associações em camundongos no teste do claro/escuro.....	76
Tabela 3	Efeitos da nimodipina, formulação lipossomal contendo nimodipina (LCNa), buspirona, WAY100635 e suas associações em camundongos no teste do labirinto em cruz elevada.....	77
Tabela 4	Efeitos da nimodipina, formulação lipossomal contendo nimodipina (LCNa), dopamina, sulpirida e suas associações em camundongos no teste do labirinto em cruz elevada.....	78
Tabela 5	Efeitos da nimodipina, formulação lipossomal contendo nimodipina (LCNa), buspirona, WAY100635 e suas associações em camundongos no teste do campo aberto.....	81
Tabela 6	Efeitos da nimodipina, formulação lipossomal contendo nimodipina (LCNa), dopamina, sulpirida, e suas associações em camundongos no teste do campo aberto	82
Tabela 7	Efeitos da nimodipina, formulação lipossomal contendo nimodipina (LCNa), buspirona, WAY100635e suas associações em camundongos no teste do <i>rota rod</i>	84
Tabela 8	Efeitos da nimodipina, formulação lipossomal contendo nimodipina (LCNa), dopamina, sulpirida e suas associações em camundongos no teste do <i>rota rod</i>	85

Avaliação do potencial antioxidante e mecanismo de ação ansiolítico de lipossomas contendo nimodipina: envolvimento dos sistemas serotoninérgico e dopaminérgico.

HELLEN KELEN MARIA MEDEIROS COIMBRA VIANA. Orientadora: Hercília Maria Lins Rolim. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas. Centro de Ciências da Saúde. Departamento de Farmácia, UFPI, 94 p., 2014.

RESUMO

A nimodipina, diidropiridina antagonista dos canais de cálcio, apresenta pouca solubilidade em água e elevada lipossolubilidade, pode atravessar facilmente a barreira hematoencefálica, foi desenvolvida como agente para relaxar a vasculatura cerebral. É rapidamente absorvida após a administração oral e apresenta biodisponibilidade reduzida explicada pelo intenso metabolismo de primeira passagem. Uma alternativa a fim de se superar as limitações é o uso de lipossomas, conforme foi demonstrado em pesquisas realizadas anteriormente, onde uma formulação lipossomal com nimodipina (LCNa) com alto teor do fármaco encapsulado, não demonstrou toxicidade em camundongos e apresentou efeito ansiolítico, antidepressivo e anticonvulsivante. Também foi demonstrado por meio da redução de íons nitritos, da remoção de radicais hidroxila e de substâncias reativas com o ácido tiobarbitúrico, que LCNa apresenta poder antioxidante. Complementando estes estudos, o presente trabalho teve como objetivo investigar o envolvimento dos sistemas serotoninérgicos e dopaminérgicos no mecanismo de ação ansiolítico de lipossomas contendo nimodipina (LCNa), bem como avaliar a seu potencial antioxidante *in vitro*. O primeiro capítulo relata a realização de uma prospecção tecnológica sobre as aplicações de lipossomas para tratamento de doenças relacionadas ao sistema nervoso central. Foram encontradas poucas patentes sobre o objeto de estudo e não foram encontradas patentes brasileiras, sugerindo que o país ainda está carente de pesquisas e inovação na área de nanotecnologia farmacêutica para vetorização de fármacos. No segundo capítulo, foi realizada a avaliação do potencial antioxidante *in vitro* da nimodipina e de LCNa por meio da eliminação do radical livre estável 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH•) e pelo 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) - ABTS, radical superóxido (O₂•-) e potencial redutor em várias concentrações (2,15; 4,30; 8,60; 12,90 e 17,20 nM). Os estudos realizados demonstraram moderada capacidade antioxidante da nimodipina contra radical DPPH (CE₅₀=127,54 nM), ABTS (CE₅₀=4,91 nM), superóxido (CE₅₀=229,36 nM) e poder redutor (CE₅₀=183,59 nM). Quando avaliada a capacidade antioxidante do LCNa nas mesmas condições experimentais que a nimodipina, foi observado maior efeito antioxidante com o valor da CE₅₀ de 0,19 nM para o radical DPPH•, 0,052 nM para o radical ABTS^{•+} e 0,949 nM para o radical superóxido e 2,35 nM para potencial redutor. O terceiro capítulo trata da investigação do envolvimento dos receptores serotoninérgicos e dopaminérgicos no mecanismo de ação ansiolítico do LCNa por meio da utilização dos testes comportamentais claro/escuro e labirinto em cruz elevada, bem como a atividade e coordenação motora por meio dos testes de campo aberto e *rota rod*. Foi verificado que LCNa produziram atividade ansiolítica sem causar sedação e sem alterar a capacidade locomotora dos animais testados. O uso dos antagonistas WAY-100635 (5 mg/kg) e sulpirida (50 mg/kg) reverteram os efeitos do LCNa (10mg/kg) nos testes de ansiedade. Sugerindo o envolvimento dos receptores serotoninérgicos 5-HT_{1A} e dopaminérgicos D₂ no mecanismo de ação ansiolítico de lipossomas contendo nimodipina. Além disso, o uso de lipossomas também demonstrou aumento na capacidade antioxidante *in vitro* da nimodipina.

Palavras-chave: Ansiolítico, Antioxidante, Lipossomas, Nimodipina.

Evaluation of antioxidant potential and mechanism of anxiolytic action of a liposome containing nimodipine: involvement of serotonergic and dopaminergic systems.

HELLEN KELEN MARIA MEDEIROS COIMBRA VIANA. Advisor: Hercília Maria Lins Rolim. Master's dissertation. Post-grad program in Pharmaceutical Sciences. Health Sciences Center. Department of Pharmacy, UFPI, 94 p., 2014.

ABSTRACT

Nimodipine, dihydropyridine calcium channel antagonist, has low water solubility and high lipid solubility, can easily cross the blood-brain barrier, was developed as an agent to relax the cerebral vasculature. It is rapidly absorbed after oral administration and has low bioavailability explained by the intense first-pass metabolism. An alternative in order to overcome the limitations is the use of liposomes, as demonstrated in studies carried out previously, where a liposomal formulation with nimodipine (LCNa) with a high content of encapsulated drug, showed no toxicity in mice and showed anxiolytic, antidepressant and anticonvulsant effects. It was also shown by the reduction of nitrite ions, from removal of hydroxyl radicals and reactive substances to thiobarbituric acid, that LCNa has antioxidant properties. In addition to these studies, this Master's dissertation aims to investigate the involvement of serotonergic and dopaminergic systems in the anxiolytic mechanism of action of liposomes containing nimodipine (LCNa) and evaluate its antioxidant potential in vitro. The first section describes the implementation of a technological forecasting application on liposomes for treatment of central nervous system diseases. There were a few patents on the subject matter and found no Brazilian patents, suggesting that the country is still lacking in research and innovation in the pharmaceutical nanotechnology area for vectorization of drugs. The second chapter, we analyzed the in vitro antioxidant activity and nimodipine LCNa by eliminating the stable free radical 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH •) and 2,2'-azinobis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) - ABTS radical superoxide ($O_2 \bullet^-$) and reducing potential in various concentrations (2.15; 4.30; 8.60; 12.90 and 17.20 nM). The studies showed moderate antioxidant activity of nimodipine against DPPH radical ($EC_{50} = 127.54$ nM), ABTS ($EC_{50} = 4.91$ nM), superoxide ($EC_{50} = 229.36$ nM) and reducing power ($EC_{50} = 183.59$ nM). When assessing antioxidant capacity LCNa under the same experimental conditions as nimodipine, a greater antioxidant effect was observed with the EC_{50} value of 0.19 nM for DPPH •, 0.052 nM for the ABTS • + radical, 0.949 nM for superoxide and 2.35 nM for reducing potential. The third chapter deals with the investigation of the involvement of serotonergic and dopaminergic receptors in the anxiolytic mechanism of action of LCNa through the use of behavioral tests light / dark and elevated plus maze, and the activity and motor skills through open field and rota rod tests. It was found that LCNa produced anxiolytic activity without causing sedation and without changing locomotor abilities of the animals tested. The use of the antagonist WAY-100635 (5 mg/ kg) and sulpiride (50 mg/ kg) reversed the effects of LCNa (10mg/ kg) in the anxiety tests. Suggesting the involvement of serotonergic 5-HT_{1A} and dopaminergic D₂ in anxiolytic mechanism of action of liposomes containing nimodipine. Furthermore, the use of liposomes has also shown an increase in antioxidant capacity in vitro of nimodipine.

Keywords: Anxiolytic, Antioxidant, Liposome, Nimodipine.

1. INTRODUÇÃO

A ansiedade é definida como um estado emocional negativo, é uma reação de defesa caracterizada por sentimento de apreensão, incerteza, preocupação, inquietação e tensão (ENNACEUR, 2014). Os transtornos da ansiedade apresentam elevada prevalência na população. A organização mundial de saúde aponta a ansiedade como a maior causa de incapacitação nos últimos anos nos Estados Unidos, causando impactos na qualidade de vida, trazendo prejuízos na vida profissional e social do indivíduo (KULESSKAYA; VOIKAR, 2014; CHIOCA, 2013).

O estudo da neurobiologia da ansiedade tem englobado a avaliação dos sistemas neuroanatômico, neuroendócrino e dos neurotransmissores. Alterações nesses sistemas podem decorrer por vários motivos, entre eles estão às experiências vividas, o meio ambiente e a predisposição genética (MARTIN et al., 2010; OLER et al., 2010; BARIK et al., 2013; CHIOCA, 2013). A elucidação das bases neuroquímicas da ansiedade permitiu a ampliação da pesquisa clínica e a evolução da sua terapêutica farmacológica (BRAGA et al., 2010).

Os tratamentos farmacológicos atualmente disponíveis para transtornos da ansiedade são os benzodiazepínicos, considerados fármacos de primeira escolha no tratamento da ansiedade, mas infelizmente estão relacionados com a ocorrência de vários efeitos adversos tais como sedação, tolerância e amnésia. E a buspirona, fármaco serotoninérgico que tem demonstrado eficácia no tratamento sem apresentar os efeitos adversos observados com o uso dos benzodiazepínicos. Porém, os efeitos ansiolíticos só aparecem após 3-4 semanas (COSTA et al., 2014; MANSOURI et al., 2014). Assim, é importante a busca por novos agentes terapêuticos seguros e eficazes para o tratamento da ansiedade e que apresentem menos efeitos adversos.

As dihidropiridinas foram desenvolvidas principalmente para tratamento de doenças cardiovasculares; no entanto, as investigações têm sido ampliadas para considerar o seu potencial para prevenir o envelhecimento cerebral. Nimodipina, 1,4-dihidropiridina, é o composto estudado mais extensivamente a este respeito. Bloqueadora seletiva dos canais de cálcio tipo L, possui alta lipossolubilidade e apresenta potente efeito vasodilatador cerebral. A neuroproteção produzida em modelos animais tratados com nimodipina após acidente vascular cerebral isquêmico forneceu a justificativa para avaliar se o tratamento crônico com esta droga poderia retardar o envelhecimento cerebral (GOTZ et al., 1994; CÁRDENAS – MÉJILA et al., 2010). O aumento da concentração de cálcio pode estar envolvido na produção

de espécies reativas de oxigênio. Assim, o bloqueio parcial dos canais de cálcio pode retardar a perda da regulação neuronal dos fluxos iônicos (LUKIC-PANIN et al., 2007).

No entanto, o uso da nimodipina está limitado pela sua baixa solubilidade e biodisponibilidade oral e extenso metabolismo de primeira passagem, sendo necessárias doses elevadas para obtenção dos efeitos desejados (NASCIMENTO, 2005). Assim, o uso de lipossomas que são sistemas versáteis, capazes de reter princípios ativos neles encapsulados, promovem liberação controlada dos fármacos, melhoram a biodisponibilidade e reduzem efeitos colaterais (FRÉZARD et al., 2005). Estudos anteriores evidenciaram a efetividade de entrega de nimodipina na forma lipossomal sem causar toxicidade nos animais testados em modelos de ansiedade (MORENO et al., 2014). Também foi sugerido um positivo potencial antioxidante de lipossomas contendo nimodipina (LCNa) que foi demonstrado pela redução de radicais nitritos, remoção de radicais hidroxila e de substâncias reativas com o ácido tiobarbitúrico (OLIVEIRA, 2013).

Nessa perspectiva, a dissertação intitulada “**Avaliação do potencial antioxidante e mecanismo de ação ansiolítico de lipossomas contendo nimodipina: envolvimento dos sistemas serotoninérgico e dopaminérgico**” foi estruturada em capítulos originados de artigos científicos submetidos a revistas nacionais e internacionais com ampla divulgação na comunidade científica. O primeiro capítulo aborda uma prospecção tecnológica, a fim de analisar o estado da arte de lipossomas com aplicação na prevenção ou tratamento de doenças do sistema nervoso central, onde são fornecidos subsídios para estudos posteriores. O segundo capítulo relata a avaliação da capacidade antioxidante *in vitro* do lipossoma contendo nimodipina (LCNa). E o terceiro capítulo, traz a investigação do envolvimento do sistema serotoninérgico e dopaminérgico no mecanismo de ação ansiolítico da formulação lipossomal contendo nimodipina (**Ilustração 1**).



Ilustração 1. Representação estrutural da dissertação.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

- Avaliar uma formulação farmacêutica lipossomal contendo nimodipina quanto ao seu potencial antioxidante *in vitro* e o envolvimento dos sistemas serotoninérgico e dopaminérgico no seu mecanismo de ação ansiolítica.

2.2 Objetivos Específicos

- Realizar uma prospecção tecnológica, realizando uma busca nos pedidos de patente em nível nacional e internacional, de lipossomas com aplicação no tratamento ou prevenção de doenças do sistema nervoso central;
- Avaliar lipossomas unilamelares pequenos (SUV) contendo nimodipina (LCNa) com adequadas características físico-químicas e alta taxa de encapsulação;
- Avaliar o potencial antioxidante *in vitro* de uma formulação lipossomal contendo nimodipina (LCNa) com ênfase nos protocolos DPPH e ABTS, radical superóxido e potencial redutor;
- Investigar a o envolvimento dos sistemas serotoninérgico e dopaminérgico no mecanismo de ação ansiolítico de lipossomas contendo nimodipina em modelos experimentais de ansiedade.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Ansiedade

A ansiedade é um estado emocional com componentes psicológicos e fisiológicos. Muitas vezes está associada com uma resposta a situações de perigo, ou ameaças reais, estresses e desafios do cotidiano, podendo apresentar sintomas somáticos, cognitivos, comportamentais, emocionais e perceptivos. A ansiedade passa a ser patológica quando apresenta um quadro emocional desagradável e incômodo que surge sem estímulo externo apropriado, sendo caracterizado quando a frequência, intensidade e duração destes eventos estão aumentadas e associadas ao prejuízo no desempenho pessoal, social ou profissional do indivíduo (CAÍRES; SHINOHARA, 2010; RODRIGUES, 2011).

A origem da ansiedade está na base de diversos mecanismos neurobiológicos, ao nível do sistema nervoso central, como: o sistema serotoninérgico, o glutamato, o sistema ácido aminobutírico e o eixo hipotálamo-hipófise-suprarrenal (PRATA, 2012).

Os tratamentos atualmente aplicados para transtornos de ansiedade incluem a farmacoterapia e terapia cognitivo-comportamental. O tratamento farmacológico da ansiedade patológica consiste no uso de benzodiazepínicos, buspirona e antidepressivos. Embora estes fármacos mostrem grande eficácia na terapia da patologia, a sua administração pode provocar vários efeitos colaterais. Por exemplo, os benzodiazepínicos podem causar alguns efeitos secundários tais como tolerância, abstinência e dependência (BRAGA, et al., 2010). Já a utilização da buspirona pode desencadear quadros de tontura, cefaléia, sonolência, distúrbios gastrointestinais, amnésia e insônia. Portanto, a busca por novos agentes terapêuticos com propriedades ansiolíticas é de suma importância (FERREIRA; ALMEIDA; FREITAS, 2012; MORENO et al., 2014).

3.2 Diidropiridinas - Antagonistas dos Canais de Cálcio

Na década de 1960, pesquisadores verificaram que determinados fármacos têm capacidade de alterar a contração do músculo cardíaco e do músculo liso ao bloquear a entrada de Ca^{2+} nos miócitos. Foi mostrado também, que o efeito de análogos da difenilpiperazina, ao inibir a contração do músculo liso vascular induzida por agonistas, podia ser superado ao elevar a concentração de Ca^{2+} no meio extracelular. Posteriormente, verificou-se que os fármacos de várias classes químicas alteram a contração do músculo

cardíaco e do músculo liso ao bloquear ou “antagonizar” a entrada de Ca^{2+} através dos canais existentes na membrana dos miócitos (MICHEL et al., 2012).

Os antagonistas dos canais de Ca^{2+} exercem seus efeitos por meio de sua ligação com a subunidade α_1 aos canais de Ca^{2+} tipo L, reduzindo o fluxo de Ca^{2+} através do canal (MICHEL et al., 2012). Os bloqueadores do canal de cálcio inibem o influxo intracelular de cálcio nas fibras musculares lisas dos vasos, causando vasodilatação das artérias coronárias e periféricas. Há duas classes de bloqueadores do canal de cálcio – diidropiridinas e não-diidropiridinas. Os bloqueadores do canal de cálcio são agentes de primeira linha em pacientes com alto risco de doença coronariana e diabetes mellitus. As não-diidropiridinas têm efeito inotrópico e cronotrópico negativo, sendo benéficas na fibrilação atrial e taquiarritmias supra-ventriculares. Diidropiridinas (amilodipina, felodipina) são seguros para uso em pacientes com insuficiência cardíaca, hipertensão ou angina estável (CARDOSO et al., 2006).

3.3 Nimodipina

A nimodipina, [isopropil(2-metoxietil), 1,4-diidro-2,6-dimetil-4-(3 – nitrofenil) – 3,5-piridina-dicarboxilada], pertencente à classe das diidropiridinas, antagonistas dos canais de cálcio, apresenta pouca solubilidade em água. A sua estrutura química apresenta duas longas cadeias laterais ligadas ao anel diidropiridínico e um grupo nitro ligado ao anel fenila, que confere ao fármaco a característica de base fraca (**Ilustração 1**). A baixa taxa de solubilidade e dissolução de fármacos pouco solúveis em água e nos fluidos gastrintestinais causa, frequentemente, uma insuficiente biodisponibilidade, uma vez que somente os fármacos dissolvidos nos líquidos gastrintestinais podem ser absorvidos, o que requer determinada hidrossolubilidade do fármaco (STEINGRABER et al., 2008).

A nimodipina possui alta lipossolubilidade e foi desenvolvida como agente para relaxar a vasculatura cerebral. É efetiva na inibição do vasoespasm cerebral e tem sido utilizada principalmente no tratamento de pacientes que apresentam defeitos neurológicos associados ao vasoespasm cerebral como hemorragia subaracnóidea (MICHEL et al., 2012). A nimodipina pode atravessar facilmente a barreira hematoencefálica. Sua ação primária é unir-se a receptores tipo L e reduzir o número de canais abertos que conduzem íons de cálcio através da membrana celular, restringindo portanto, o fluxo de cálcio dentro das células e ainda produz efeitos anti-vasoconstrictores e ação vasodilatadora sobre arteríolas (CÁRDENAS – MÉJILA et al., 2010). É rapidamente absorvida após a administração oral,

com pico de concentração plasmática, geralmente atingido em uma hora. Em estudos farmacocinéticos com pacientes sadios, mostrou biodisponibilidade de 4 a 13% e em pacientes que sofreram hemorragia subaracnóidea de 2 a 28%. A biodisponibilidade reduzida pode ser explicada pelo intenso metabolismo de primeira passagem (NASCIMENTO, 2005). Assim, diante das limitações da administração oral da nimodipina, como baixa hidrossolubilidade e intenso metabolismo de primeira passagem com biodisponibilidade reduzida, são necessárias doses elevadas do fármaco com o objetivo de se obter os efeitos desejados. Uma alternativa a fim de se superar as limitações é o uso de lipossomas, conforme foi demonstrado em pesquisas realizadas anteriormente, onde uma formulação lipossomal contendo nimodipina com alto teor do fármaco encapsulado, não demonstrou toxicidade em camundongos e apresentou efeito ansiolítico, antidepressivo e anticonvulsivante (MORENO, 2011; GRUPTA et al., 2012).

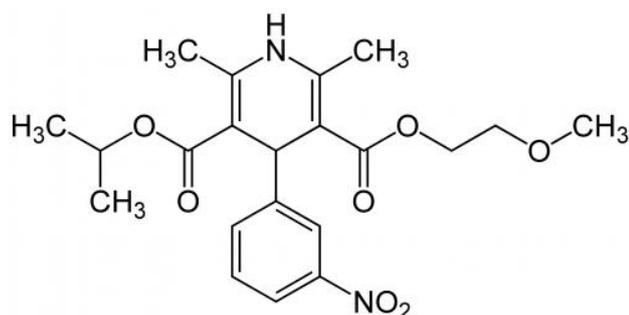


Ilustração 1: Estrutura Química da Nimodipina (C₂₁H₂₆N₂O₇)

3.4 Lipossomas

Os lipossomas são vesículas microscópicas compostas de uma ou mais bicamadas lipídicas concêntricas, separadas por um meio aquoso, sendo, portanto denominadas de unilamelares e multilamelares. Quanto ao tamanho as vesículas unilamelares podem ser pequenas – SUV (small unilamellar vesicles) e lipossomas unilamelares grandes – LUV (large unilamellar vesicles). Eles podem encapsular substâncias hidrofílicas e /ou lipofílicas, servem como carreadores de fármacos, biomoléculas ou agentes de diagnóstico (BATISTA et al., 2007).

São sistemas altamente versáteis, cujo tamanho, lamelaridade, superfície, composição lipídica, volume e composição do meio aquoso interno podem ser manipulados em função dos requisitos farmacêuticos e farmacológicos. Os lipossomas são capazes de reter princípios ativos encapsulados e, portanto, de protegê-los *in vivo* de uma eliminação ou degradação

rápida. Suas propriedades de liberação lenta levam à redução da concentração de princípio ativo na forma livre, e à prolongação de sua presença no organismo. Esse aumento na biodisponibilidade do princípio ativo pode levar à potencialização da sua atividade biológica, assim como à redução dos seus efeitos colaterais (FRÉZARD et al., 2005). Ou seja, podem aumentar a potência e/ou reduzir a toxicidade.

Os lipossomas possuem inúmeras vantagens em relação a outras formas farmacêuticas, dentre as quais estão a alta especificidade, que permite o exercício de sua atividade farmacológica, com diminuição de efeitos secundários; são vetores medicamentosos pois conseguem atingir um alvo bem determinado e até mesmo receptores celulares específicos, tornando-se menos tóxicos (CUNHA et al., 2007).

Diante de tais benefícios e no sentido de dar continuidade aos estudos anteriores que geraram pedido de depósito de patente ao INPI com a formulação lipossomal contendo nimodipino (LCNa), será verificada a influência de outros parâmetros como forma de esclarecer o mecanismo de ação ansiolítico e dar novas evidências do potencial antioxidante e neuroprotetor deste fármaco em nanovesículas lipossomais.

3.5 Sistema serotoninérgico

A serotonina (5-HT) participa de inúmeros processos fisiológicos e patológicos, como a ansiedade. A sua neurotransmissão está envolvida na regulação do sono, do humor, na vigilância e funções cognitivas como a aprendizagem e memória. Para além da regulação destes processos, esta tem demonstrado um papel importante na modulação da ansiedade. Os receptores da 5-HT encontram-se disseminados no núcleo rafe. Dependendo da sua localização no núcleo rafe as ramificações dos receptores atingem estruturas cerebrais diferentes. (KIRBY et al., 2003).

A serotonina é sintetizada a partir da triptofano hidroxilase, que converte o triptofano em 5- hidroxitriptofano, o qual é convertido em serotonina pela L- aminoácido aromático descarboxilase (GOLAN et al., 2009). A 5-HT é captada pelas vesículas sinápticas e quando se dá o impulso nervoso é liberada por exocitose. Pós sinápticamente pode atuar em receptores 5-HT₁, 5-HT₂, 5-HT₃, 5-HT₄, 5-HT₅, 5-HT₆ e 5-HT₇, existem ainda receptores pré-sinápticos inibitórios do tipo 5-HT_{1A} nos corpos celulares atuando como autoreceptores inibitórios, e também podem localizar-se a nível pós-sináptico nos neurônios serotoninérgicos no hipocampo, córtex pré-frontal e amígdala e ainda, 5-HT_{1B} nos terminais nervosos dos neurônios serotoninérgicos. Todos esse receptores, à exceção de 5-HT₃, ligados a canais

iônicos, estão relacionados a proteína G. O principal mecanismo de retirada de 5-HT da fenda sináptica é recaptação pelo terminal nervoso (BORDUKALO-NIKSIC et al., 2010; FERNANDES, 2012).

Atualmente, sabe-se que existem cerca de dezessete receptores diferentes da 5-HT. Destes receptores 5-HT_{1A} em conjunto com os receptores 5-HT_{1B} são os mais importantes na diminuição da ansiedade (SANTOS et al., 2008; BORDUKALO-NIKSIC et al., 2010).

Sistema Dopaminérgico

A dopamina é um neurotransmissor catecolamínico. Como o próprio nome sugere, a estrutura básica das catecolaminas consiste em um catecol (3,4-diidroxibenzeno) conectado a um grupo amina por uma ponte etil (GOLAN et al., 2009). A dopamina é um importante neurotransmissor cerebral, que exerce seus efeitos por meio de ligações com receptores específicos de membrana, os quais estão classificados em D₁ e D₂ (ZARRINDAST et al., 2012).

A síntese da dopamina tem início com a captação do aminoácido L-tirosina, o qual é transformado pela tirosina hidroxilase, em L-DOPA e depois, pela DOPA-descarboxilase em dopamina. A dopamina é armazenada pelas vesículas sinápticas, a qual é liberada por exocitose quando chega impulso nervoso. Pós-sinápticamente, pode atuar em receptores das famílias D₁ (D₁ e D₅) ou D₂ (D₂, D₃ ou D₄). Existem ainda receptores pré-sinápticos inibitórios de tipo D₂ que estão localizados tanto nos terminais como nos corpos celulares. Todos os receptores estão ligados a proteína G. O principal mecanismo de retirada da dopamina da fenda sináptica é a recaptação pelo terminal nervoso. A monoaminoxidase tipo B (MAOB) degrada a dopamina intraneuronal que tem como principal metabólito o ácido homovalínico (HMV) (GOLAN et al., 2009; FERNANDES, 2012).

A dopamina modula os mecanismos de medo e ansiedade. Alguns trabalhos relacionam a depleção de dopamina aos sintomas de ansiedade social (PIRI et al., 2013). Sugerindo que estratégias farmacológicas que promovam o aumento da função dopaminérgica podem constituir uma alternativa para o tratamento de sintomas associados à ansiedade (KAUER-SANTANNA et al., 2002). Desequilíbrios na sinalização de dopamina parecem contribuir para uma variedade de doenças, incluindo as de movimento (ex: doença de Parkinson), função executiva (ex: de déficit de atenção e hiperatividade), transtornos psiquiátricos (ex: esquizofrenia) e da toxicod dependência (FREDERICK, 2013).

3.7 Estresse oxidativo e lipossomas

O excesso de radicais livres no organismo leva ao estresse oxidativo, o que pode estar associado às causas de doenças crônicas como, infarto do miocárdio, parkinson, envelhecimento precoce e câncer (COSTA et al., 2013). O estresse oxidativo que é definido como desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio e sua ineficiente decomposição pelo sistema antioxidante, tem sido implicado na fisiologia da depressão, ansiedade e outras desordens psiquiátricas (PATKI et al., 2013).

Esse fenômeno pode ocorrer após a exposição prolongada a agentes oxidantes, como os radicais livres, ou pela diminuição da capacidade antioxidante desse sistema. Conceitualmente, radicais livres são átomos ou moléculas que possuem um ou mais elétrons não pareado no orbital externo, dando-lhe uma configuração espacial que gera elevada instabilidade (BARBOSA et al., 2010).

Várias pesquisas demonstraram o envolvimento dos lipossomas no aumento da eficácia antioxidante dos fármacos testados, protegem células do estresse oxidativo (RENGEL et al., 2005), reduzem a peroxidação lipídica (TIAN et al., 2007) e promovem de melhor ativação de enzimas antioxidantes (PENG et al., 2010). Estudo anterior realizado em nosso grupo, sugeriu um positivo potencial antioxidante dos LCNa que foi demonstrado pela redução de radicais nitritos, remoção de radicais hidroxila e de substâncias reativas com o ácido tiobarbitúrico (OLIVEIRA, 2013).

A partir disso, é sugerida a importância de se realizar estudos que tenham o objetivo de avaliar a ação neuroprotetora de lipossomas contendo nimodipina e seu potencial para prevenir e tratar doenças que acometem o sistema nervoso central bem como mecanismos de ação envolvidos.

REFERÊNCIAS

BATISTA, C. M.; CARVALHO, C. M. B.; MAGALHÃES, N. S. S. Lipossomas e suas aplicações terapêuticas: Estado da arte. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 43, n. 2, p. 167-179, 2007.

BARBOSA, K. B. F.; COSTA, N. M. B.; ALFENAS, R. D. C. G.; PAULA, S. O.; MINIM, V. P. R.; RESSAN, J. Oxidative stress: concept, implications and modulating factors. **Revista de Nutrição**, v. 23, n. 4, p. 629-643, 2010.

BARIK, J.; MARTI, F.; MOREL, C.; FERNANDEZ, S.P.; LANTERI, C.; GODEHEU, G.; TASSIN, J.P.; MOMBÉREAU, C.; FAURE, P.; TRONCHE, F. Chronic stress triggers social aversion via glucocorticoid receptor in dopaminergic neurons. **Science**, v. 339, n. 6117, p. 332-335, 2013.

BORDUKALO-NIKSIC, T.; MOKROVIC, G.; STEFULJ, J.; ZIVIN, M.; JERNEJ, B.; CICINSTAIN, L. 5HT-1A receptors and anxiety-like behaviours: Studies in rats with constitutionally pre-regulated own regulated serotonin transporter. **Behavioural Brain Research**, v.213, p. 238-245, 2010.

BRAGA, J. E. F.; PORDEUS, L. C.; SILVA, A. T. M. C.; PIMENTA, F. C. F.; DINIZ, M. F. F. M.; ALMEIDA, R. N. Ansiedade Patológica: Bases Neurais e Avanços na Abordagem Psicofarmacológica. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**, v. 14, n. 2, p. 93-100, 2010.

CAÍRES, M.C.; SHINOHARA, H. Transtornos de ansiedade na criança: um olhar nas comunidades. **Revista Brasileira de Terapias Cognitivas**, v.6, n. 1, p. 62-84, 2010.

CÁRDENAS – MÉJILA, A.; GOMEZ, C.G.; ESTRADA - TRISTÁN, C. A.; AGUIRRE - CRUZ, M.L. Efecto del nimodipino sobre la integración de injertos nerviosos en ratas. **Cirurgía Plástica**, v. 20, n.1, p. 6-16 -16, 2010.

CARDOSO, C. E. P.; TOREJANE, D.; GHIGGI, R. F. **Evidências no tratamento da hipertensão arterial em idosos**. Arquivos Catarinenses de medicina. v. 35, p. 85-91,2006.

CHIOCA, L.R. **Avaliação do mecanismo de ação do efeito tipo ansiolítico da inalação do óleo essencial de lavanda em camundongos**. 2013. 92f. Tese (Doutorado em farmacologia) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2013.

COSTA, A. B.; OLIVEIRA, A. M. C; SILVA, A. M. O.; MANCINI-FILHO, J.; LIMA, A. Atividade antioxidante da polpa, casca e sementes de noni (*Morinda citriflora* Linn). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 35, n. 2, p. 345-354, 2013.

COSTA, J.P.; OLIVEIRA, G.A.L.; ALMEIDA, A.A.C.; ISLAM, T.; SOUSA, D.P.; FREITAS, R.M. Anxiolytic- like effects of phytol: Possible involvement of GABAergic transmission. **Brain Research**, v. 1547, p. 34- 42, 2014.

CUNHA, T. N. da; SOARES, I. C.; GASPARI, E. “Em busca de lipossomas inteligentes para administração de drogas para tuberculose.” **BEPA – Boletim Epidemiológico Paulista**, v. 4, n.39, 2007.

ENNACEUR, A. Tests of unconditioned anxiety - Pitfalls and disappointments. **Physiology & Behavior**, v. 135, p. 55-71, 2014.

FERNANDES, M.L. **Investigação da ação central do timol em modelos comportamentais de ansiedade, depressão e convulsão em camundongos**. 2012. 108f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2012.

FERREIRA, P.B.; ALMEIDA, A.A.C.; FREITAS, R.M. Efeito antioxidante da buspirona no modelo de epilepsia induzida por pilocarpina. **Revista de psiquiatria clínica**, v. 39, n. 5, p. 153-156, 2012.

FREDERICK, A.L. **Genetic dissection of behavioral effects of the dopamine receptor agonist SKF83959 does not support the D1/D2 receptor heteromer model.** 2013. 185f. Dissertation (Doctorate – Doctor of Philosophy in Neuroscience) – Faculty raduate School of Vanderbit University, Nashville, 2013.

FREZARD, F.; SCHETTINI, D. A.; ROCHA, O. G. F.; DEMICHELI, C. Lipossomas: propriedades físico-químicas e farmacológicas, aplicações na quimioterapia à base de antimônio. **Química Nova**, São Paulo, v. 28, n. 3, 2005.

GOLAN, D. E. et al. **Princípios e Farmacologia: A Base Fisiopatológica da Farmacologia.** Guanabara Koogan. Rio de Janeiro, 2009.

GOTZ, M.E; KUNING, G; RIEDERER, P., YAUDIM, M.B. Oxidative stress: Free radical production in neural degeneration. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 63, p. 37-122, 1994.

GRUPTA, A.; ARORA, A.; MENASKHI, A.; SEGHAL, A.; SEGHAL, R. Nanotechnology and Its Applications in Drug Delivery: A Review. **International Journal of Medicine and Molecular Medicine**.v. 3, n. 1, p. 1-9, 2012.

KAUER-SANTANNA, M.; LAVINSKYA, M.; AGUIARA, R. W.; KAPCZINSKIA, F. O papel do sistema dopaminérgico na fobia social. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 24, p. 50-52, 2002.

KIRBY, L.G. et al. Distinguishing characteristics of serotonin and non-serotonin-containing cells in the dorsal raphe nucleus: electrophysiological and immunohistochemical studies. **Neuroscience**, v.116, p.669-683, 2003.

KULESSKAYA, N.; VOIKAR, V. Assessment of mouse anxiety-like behavior in the light–dark box and open-field arena: Role of equipment and procedure. **Physiology & Behavior**, v. 133, p.30-38, 2014.

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

MARTIN, E.I.; RESSLER, K.J.; BINDER, E.; NEMEROFF, C.B. The neurobiology of anxiety disorders: brain imaging, genetics, and psychoneuroendocrinology. **Clin Lab Med**, v. 30, p. 865-891, 2010.

MICHEL, T.; HOFFMAN, B. B. Tratamento da isquemia miocárdica e da hipertensão. In: BRUTON, L. L.; CHABENER, B. A.; KNOLLMANN, B. C. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica de Goodman & Gilman.** São Paulo: Mc Graw Hill, 2012, p. 745 – 788.

MORENO, L. C. G. A. I. **Delineamento e caracterização de lipossomas contendo nimodipina para uso direcionado a doenças neurodegenerativas.** 2011. 105f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Universidade Federal do Piauí – UFPI, Piauí.

MORENO, L. C. G. A. I.; OLIVEIRA, G. Z. S.; CAVALCANTI, I. M. F.; SANTOS-MAGALHÃES, N. S.; ROLIM, H. M. L.; FREITAS, R. M. Development and evaluation of liposomal formulation containing nimodipine on anxiolytic activity in mice. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 116, p.64–68, 2014.

MANSOURI, M.T.; SOLTANI, M.; NAGHIZADEH, B.; FARBOOD, Y.; MASHAK, A.; SARKAKI, A. A possible mechanism for the anxiolytic-like effect of gallic acid in the rat elevated plus maze. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 117, p. 40-46, 2014.

NASCIMENTO, V. S. **Estudo do processo convulsivo e das ações da nimodipina no modelo de convulsão com pilocarpina em ratos jovens**. 2005. 151f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) Universidade Federal do Ceará – UFC, Ceará.

OLER, J.A.; FOX, A.S.; SHELTON, S.E.; ROGERS, J.; DYER, T.D.; DAVIDSON, R.J.; SHELLEDY, W.; OAKES, T.R.; BLANGERO, J.; KALIN, N.H. Amygdalar and hippocampal substrates of anxious temperament differ in their heritability. **Nature**, v. 466, n. 7308, p. 864-868, 2010.

OLIVEIRA, G. Z. S. **Desenvolvimento e caracterização de uma formulação farmacêutica lipossomal contendo nimodipina: ensaios pré-clínicos com ênfase em transtornos psicossociais**. 2013. 123f. Dissertação (Mestrado em Ciências farmacêuticas), Universidade Federal do Piauí – UFPI, Piauí.

PATKI, G.; SOLANKI, N.; ATROOZ, F.; ALLAN, F.; SALIN, S. Depression, anxiety – like behaviour and memory impairment are associated with increase oxidative stress and inflammation in a rat model of social stress. **Brain Research**, v. 1539, p. 73-86, 2013.

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

PIRI, M.; AYAZI, E.; ZARRINDAST, M.R. Involvement of dorsal hippocampal dopamine D₂ receptors in histamine – induced anxiogenic – like effects in mice. **Neuroscience Letters**, v. 550, p. 139 – 144, 2013.

PRATA, F. P. M. **Tratamento da ansiedade**. 2012. 65f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade de Ciências da Saúde, Porto

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

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

SANTOS, L.; ANDRADE, T.; ZANGROSSI, H. 5-HT_{1A} receptors in the dorsal hippocampus mediate the anxiogenic effect induced by the stimulation of 5-HT neurons in the median raphe nucleus. **European Neuropsychopharmacology**, v. 18, p. 286-294, 2008.

STEINGRABER, T.; SHTOLTZ, T.; OENING RODRIGUES, P. Avaliação da Influência de adjuvantes não poliméricos solúveis na liberação de nimodipino a partir de formulações matriciais de liberação prolongada. **Revista colombiana de ciencias químico farmacéuticas**, Bogotá, v. 37, n. 2, June 2008 .

TIAN, Y. Y.; GE, L.; DUAN, X .L.; GAO, Z. Q.; CHANG, Y. Z. Lycopene liposomes: lycopene release in vitro and pharmaceutical behaviors and antioxidation in vivo. **Acta Pharmaceutica Sinica**, v. 42, n. 10, p. 1107-1111, 2007.

ZARRINDAST, M.R.; NASEHI, M.; POURNAGHSHBAND, M.; YEKTA, B.G. Dopaminergic system in CA1 modulates MK-801 induced anxiolytic-like responses. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 103, p. 102-110, 2012.

**CAPÍTULO I: Prospecção tecnológica de lipossomas para tratamento de
doenças relacionadas com o sistema nervoso central**

PROSPECÇÃO TECNOLÓGICA DE LIPOSSOMAS PARA TRATAMENTO DE DOENÇAS RELACIONADAS COM O SISTEMA NERVOSO CENTRAL

RESUMO

Doenças que afetam o sistema nervoso central como a ansiedade, a depressão, a Alzheimer, o Parkinson, a epilepsia e a esquizofrenia afetam milhões de pessoas em todo o mundo. Estas patologias representam importantes problemas de saúde pública. O tratamento e prevenção destas doenças é urgente e necessário. A aplicação da nanotecnologia farmacêutica é uma boa alternativa na produção de novos fármacos fazendo uso de lipossomas, nanocápsulas, nanopartículas, nanoesferas e ciclodextrinas. Dentre os quais podem ser destacados os lipossomas, que são um dos sistemas de fornecimento de droga mais importantes e mais bem sucedidos e são capazes de reduzir os efeitos secundários como sonolência, letargia e sintomas gastrointestinais e também de promover aumento no índice terapêutico de fármacos encapsulados. Neste sentido, objetivo do presente estudo foi realizar uma prospecção tecnológica, em bancos nacionais e internacionais, de sistemas lipossomais com aplicação para as doenças do sistema nervoso central citadas, analisando a quantidade e os tipos de registros de depósitos de pedido de patente depositados na atualidade. A análise dos resultados obtidos mostrou que há um relevante número de pesquisas sobre o termo lipossomas isoladamente. Porém, existe uma carência de inovações sobre lipossomas para a prevenção de doenças relacionadas com o sistema nervoso central, demonstrando que são necessárias pesquisas relacionadas ao tema. Entretanto, foi observado que nos últimos anos houve um aumento no número de pesquisas e inovação sobre o tema, sendo que a classificação internacional predominante foi A61K, que está relacionada a aplicações para fins médicos, odontológicos e/ou higiene. Foi encontrado um maior número de pedidos de depósitos de patentes WIPO e os Estados Unidos foram o maior depositário de patentes. No entanto, não foram encontradas patentes brasileiras, demonstrando que o país ainda está carente de pesquisa e inovação na área de nanotecnologia farmacêutica. Diante disso, faz-se necessário incentivar o desenvolvimento de pesquisas voltadas ao emprego da nanotecnologia farmacêutica no tratamento e prevenção de doenças do sistema nervoso central, visto que elas têm aumentado nos últimos anos.

Palavras-chave: lipossomas, doenças, sistema nervoso central.

INTRODUÇÃO

A depressão e a ansiedade são desordens mentais de grande prevalência na população geral. Dados da Organização Mundial da Saúde (World Health Organization, WHO), a depressão poderá se tornar a segunda causa de morte ou incapacidade em 2020 (WHO, 2005; ROMANINI et al., 2006). Atualmente, o tratamento farmacológico da ansiedade é feito com ‘uso de benzodiazepínicos, buspirona e antidepressivos, os quais têm demonstrado eficácia. No entanto, podem causar efeitos secundários inconvenientes ao paciente. Assim, diante da elevada prevalência e da incidência de efeitos indesejáveis, a busca por novos agentes terapêuticos com propriedades ansiolíticas é necessária (MORENO et al., 2014).

A doença de Alzheimer (DA) e doença de Parkinson (DP) são as duas doenças neurodegenerativas mais comuns relacionadas com a idade (YAN et al., 2013). Clinicamente, os pacientes (DA), inicialmente, apresentam perda de memória de curto prazo, posteriormente, seguido por disfunção executiva, confusão, agitação e distúrbios comportamentais (BEKRIS et al., 2010). Em 2050, é esperado um novo caso de DA para desenvolver a cada 33 segundos, ou quase um milhão de novos casos por ano, e a prevalência estimada total deverá ser 13,8 milhões (ALZHEIMER ASSOCIATION, 2014).

Recentes avanços em nanotecnologia como é o caso dos lipossomas têm sido estudados para entrega de fármacos e moléculas através da barreira hematoencefálica (BHE) para tratamento de doenças do sistema nervoso central (SNC) como epilepsia, desordens psiquiátricas como ansiedade, depressão e esquizofrenia, além das doenças neurodegenerativas como Alzheimer (DA) e Parkinson (DP) (WONG et al., 2013; KUMAR e KUMAR, 2014).

A doença de Parkinson (DP) é caracterizada por ser uma doença progressiva e degenerativa que afeta aproximadamente 1-2% da população com mais de 65 anos de idade (RIBEIRO et al., 2004). Atualmente, a sua etiologia não está completamente conhecida, mas existe uma hipótese de que a perda gradual de neurônios na substância negra do mesencéfalo é causada por possíveis fatores mentais genéticos e ambientais e pelo próprio envelhecimento (MANCOPEs et al., 2013).

A esquizofrenia é um transtorno da função cerebral cujos sintomas consistem de separação da realidade com a formação de ilusão, alucinações, desregulação emocional e comportamento desorganizado. É uma das principais causas de suicídio e atualmente, não existem tratamentos curativos para a esquizofrenia (MILLIER et al., 2014; CARLBORG et al., 2010; VAN OS et al., 2006, ANDREASEN et al., 2005;). Os transtornos esquizofrênicos são

condições mentais graves e crônicas que afetam 26 milhões de pessoas no mundo e resultam em deficiência moderada ou grave em 60% dos casos (LORA et al., 2012; EATON et al., 2008).

A epilepsia é o mais freqüente transtorno neurológico sério e importante problema de saúde pública. Sua incidência nos países em desenvolvimento é o dobro da dos países desenvolvidos (MARCHETTI et al., 2005). As crises convulsivas são caracterizados por um breve período de agitação involuntária descontrolada. Eles podem ser parcial, envolvendo apenas um lado do corpo, ou generalizada, envolvendo todo o corpo, e que podem ser acompanhados por perda de consciência e de controle da função do intestino ou da bexiga (MEYER et al., 2010). Em alguns casos o tratamento causa efeitos indesejáveis, sendo comum letargia, tonturas e aumento de ponderal, mas quadros mais graves de reação alérgica e depressão e psicose podem ocorrer (FERNANDES, 2013).

Considerando que representam importantes problemas de saúde pública, a busca por novos tratamentos eficazes e que diminuam efeitos indesejáveis é necessária. A intervenção da nanotecnologia por meio do uso de lipossomas pode representar uma alternativa.

Devido à sua versatilidade estrutural em termos de tamanho, composição, carga da superfície, fluidez da membrana e habilidade para incorporar fármacos hidrofílicos e/ou lipofílicos, os lipossomas se tornaram potentes carreadores para vários tipos de terapias, são um dos sistemas de entrega de fármacos mais importantes. As formulações lipossomais podem reduzir a toxicidade dos fármacos e melhorar o índice terapêutico. (BATISTA et al., 2007; CERN et al., 2012). Podendo assim, representar uma alternativa para a prevenção ou tratamento de doenças do sistema nervoso central.

Assim, o principal objetivo desse trabalho foi realizar uma prospecção tecnológica, realizando uma busca nos pedidos de patente em nível nacional e internacional, de lipossomas com aplicação no tratamento ou prevenção de doenças do sistema nervoso central, no sentido de oferecer um panorama geral do estado da arte em relação ao tema.

METODOLOGIA

A prospecção foi realizada com base nos pedidos de patentes depositados no Escritório Europeu de Patentes (*European Patent Office – EPO*), na Organização Mundial de Propriedade Intelectual (*World Intellectual Property Organization - WIPO*), no Escritório Americano de Patentes e Marca Registrada (*United States Patent and Trademark Office -*

USPTO) e no banco de dados do Instituto Nacional de Propriedade Industrial (INPI) do Brasil.

A pesquisa foi realizada em abril de 2014 e foram utilizados como palavras-chave os termos “*liposome* ou lipossoma”, “*liposome and anxiety*” ou “lipossoma a ansiedade”, “*liposome and depression*” ou “lipossoma e depressão”, “*liposome and Alzheimer*” ou “lipossoma e Alzheimer”, “*liposome and Parkinson*” ou “lipossoma e Parkinson”, “*liposome and schizophrenia*” ou “lipossoma e esquizofrenia”, e ainda, “*liposome and epilepsy*” ou “lipossoma e epilepsia”. Os termos em inglês foram utilizados para as bases internacionais, enquanto que os termos em português para a busca de documentos em base nacional, sendo considerados válidos os documentos que apresentassem esses termos no título e/ou resumo. Foram analisados todos os pedidos de patente existentes até abril de 2014 (**Ilustração 1**).

Ilustração 1: Esquematização da realização da busca de patentes



RESULTADOS E DISCUSSÃO

Teixeira (2013) em seu trabalho sumarizou como objetivo geral de uma prospecção tecnológica identificar áreas de pesquisa estratégica e as tecnologias genéricas emergentes que têm a propensão de gerar os maiores benefícios econômicos e sociais. O método de previsão (*forecasting*) faz previsão probabilística do desenvolvimento futuro das tecnologias atuais por meio de quantificações e extrapolação de tendências.

Na pesquisa efetuada, foram encontrados muitos documentos envolvendo os termos “*liposome*” ou lipossoma, com maior destaque na base europeia, EPO (9024). Entretanto, quando confrontados os termos “*liposome and anxiety*” ou “lipossoma e ansiedade”, “*liposome and depression*” ou “lipossoma e depressão”, “*liposome and Alzheimer*” ou “lipossoma e Alzheimer”, “*liposome and Parkinson*” ou “lipossoma e Parkinson”, “*liposome and schizophrenia*” ou “lipossoma e esquizofrenia”, e ainda, “*liposome and epilepsy*” ou “lipossoma e epilepsia” observou-se que o número de pedidos de depósito de patentes é reduzido, sessenta e nove registros selecionados em abril de 2014 com a combinação dos termos citados (**Tabela 1**). Destes, apenas três registros foram depositados no USPTO, foi observada uma maior proporção de depósitos de patentes nas bases do WIPO e EPO, 47 e 19 resultados respectivamente e, não foram encontrados resultados nas buscas realizadas na base brasileira (INPI).

Tabela 1: Número de depósitos de patentes por base de dados envolvendo os diferentes termos utilizados

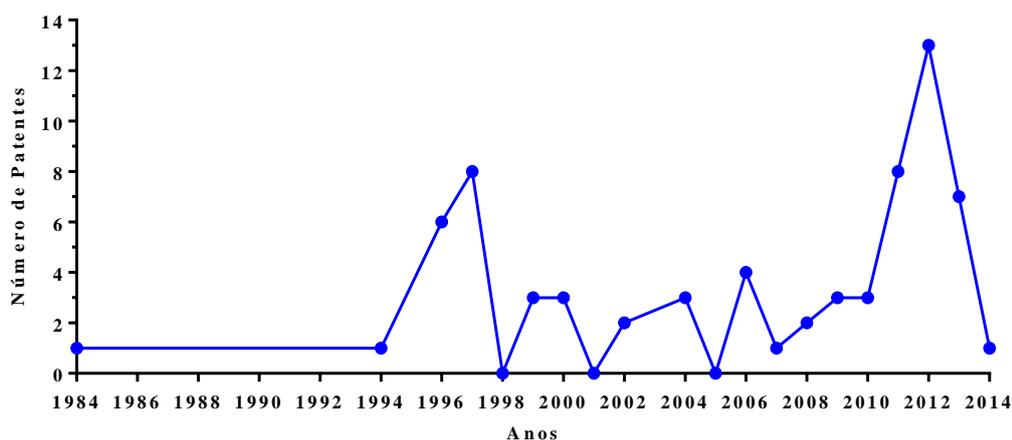
Termos de Busca	INPI	USPTO	WIPO	EPO
<i>Liposome</i> ou lipossoma	103	749	341	9024
<i>Liposome and anxiety</i> ou Lipossoma e ansiedade	0	0	0	1
<i>Liposome and depression</i> ou Lipossoma e depressão	0	0	6	1
<i>Liposome and schizophrenia</i> ou Lipossoma e esquizofrenia	0	0	1	1
<i>Liposome and Parkinson</i> ou Lipossoma e Parkinson	0	3	16	4
<i>Liposome and Alzheimer</i> ou Lipossoma e Alzheimer	0	0	19	11
<i>Liposome and Epilepsy</i> ou Lipossoma e epilepsia	0	0	5	1

A maior proporção encontrada no WIPO pode ser justificada pelo fato de que WIPO administra os depósitos de patentes através do TCP (Tratado de Cooperação de Patentes), mediante um pedido de patente no TCP, os candidatos podem procurar simultaneamente a proteção de uma invenção em 148 países em todo o mundo (WIPO, 2014). Os demais escritórios tratam das patentes localizadas nos Estados Unidos (USPTO), Europa (EPO) e Brasil (INPI).

A inexistência de patentes sobre os temas em estudo no Brasil pode ser em consequência do fato de que, apesar do desenvolvimento de sua indústria de medicamentos no Brasil, a geração de tecnologia é desejável. As atividades de pesquisa científica e tecnológica têm se restringido ao meio acadêmico, falta articulação entre os agentes dos Sistemas de Inovação, faltam Políticas Públicas e falta de incentivo financeiro (VIEIRA; OHAYON, 2007).

Conforme se observa na **Ilustração 2**, entre os anos de 1984 à 1994 havia apenas um (01) pedido de depósito de patente, no entanto de 2011 até abril de 2014, foram identificadas 29 patentes o que corresponde a 42% do total encontrado entre os anos de 1984 a 2014. O que demonstra aumento das pesquisas e inovação nos últimos anos.

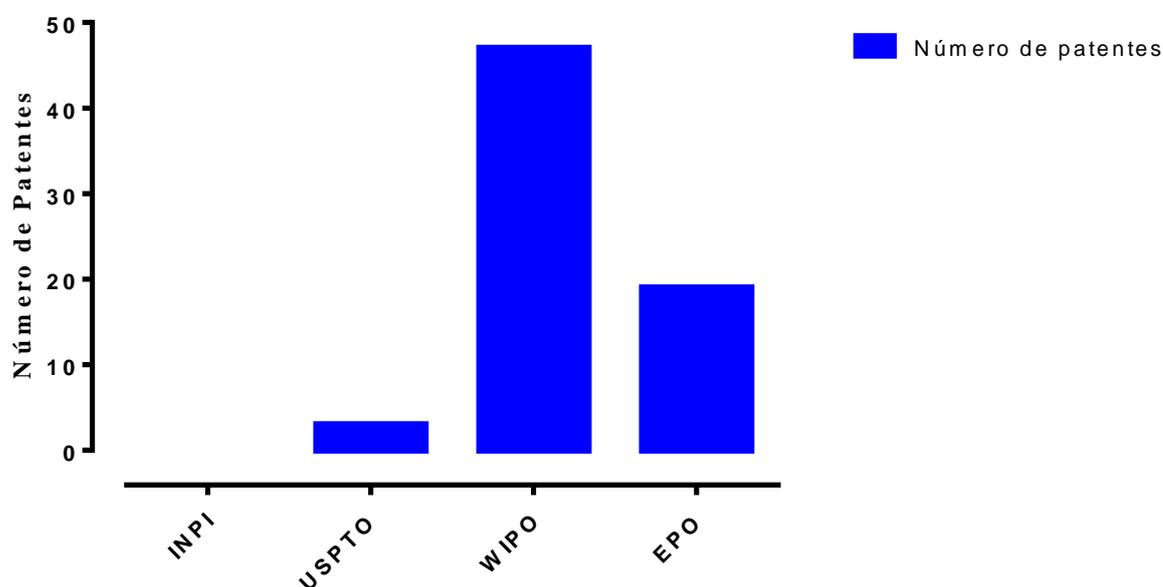
Ilustração 2: Números de depósitos de patentes utilizando os termos em estudo durante os anos de 1984 e 2014.



Ainda a respeito do número de patentes depositadas nos escritórios internacionais e no Brasil, outra observação pode ser feita comparando os resultados das buscas utilizando o termo lipossoma combinado com as doenças do sistema nervoso central em questão (**Ilustração 3**): existe um maior o número de patentes depositadas no escritório europeu em relação aos demais e que, o WIPO só fica à frente do INPI. Esse dado demonstra que tem

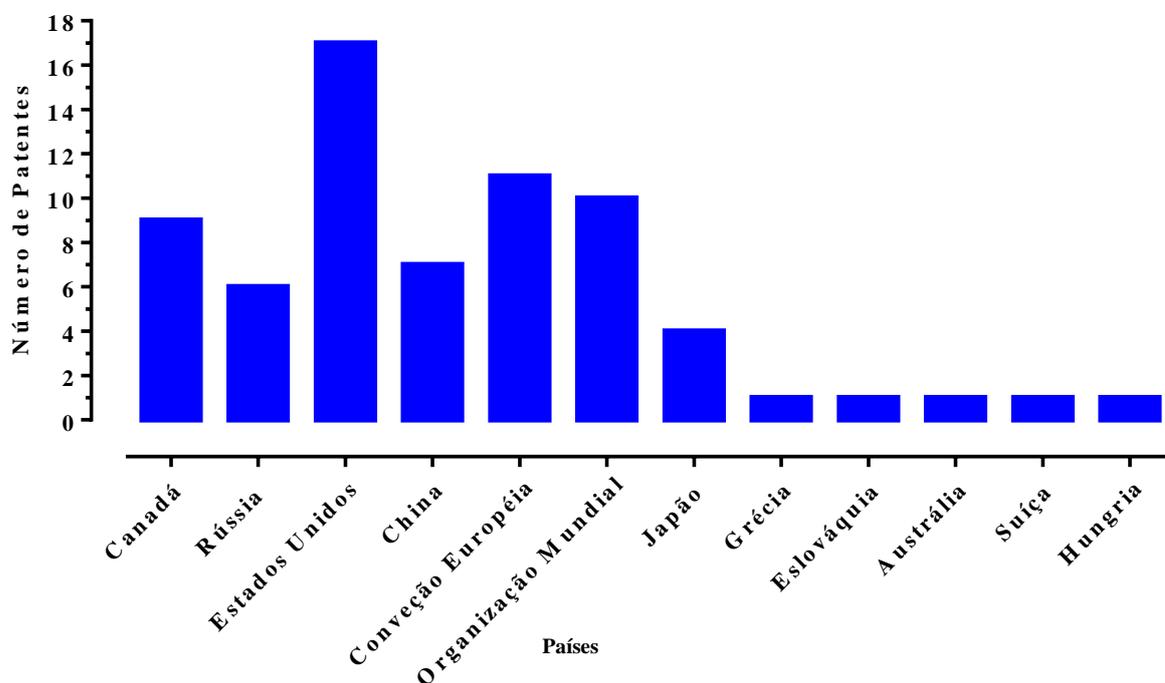
havido pesquisa e proteção das inovações em nanotecnologia na Europa, porém, o registro de patentes de lipossomas para o tratamento e prevenção de desordens neurológicas é maior no WIPO.

Ilustração 3 – Total de depósitos de patentes pesquisados nas bases do INPI, EPO, WIPO, USPTO utilizando a combinação dos termos de busca “lipossoma e doenças do sistema nervoso central”. *lipossoma e doenças do sistema nervoso central se refere a soma dos termos de busca que constam na Tabela 1, da associação do termo “*lipossoma*” e as doenças do sistema nervoso central em estudo.



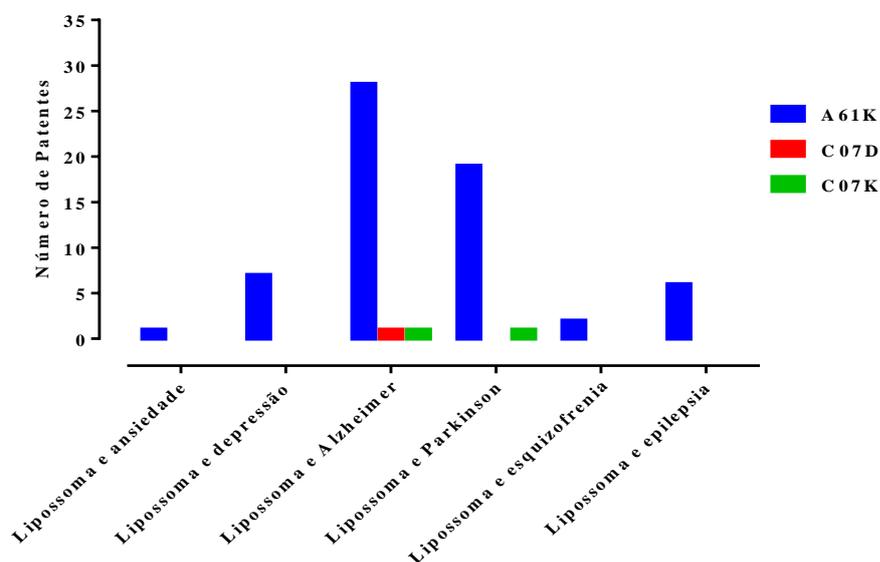
No entanto, apesar da prevalência dos depósitos se dá no EPO e WIPO, os Estados Unidos é quem faz maior número de depósito de patentes, mostrando que o país tem investido mais na inovação tecnológica em estudo (**Ilustração 4**).

Ilustração 4 – Distribuição de patentes depositadas nos bancos de dados EPO, WIPO, USPTO e INPI por países.



Considerando que um maior número de depósito de patentes com a combinação dos termos em estudo se deu nas bases WIPO e EPO, a pesquisa seguiu com a análise quanto à aplicação dos lipossomas patenteados para as desordens neurológicas em questão. A **Ilustração 5** está representando a distribuição quanto a Classificação Internacional de Patentes (CIP), onde se pode observar que houve uma predominância A61K, na qual a classificação “A” corresponde a necessidades humanas, e mais especificamente, a subclasse A61K está relacionada a aplicações para fins médicos, odontológicos e/ou higiênicos. Além dessa classificação também aparece a classe “C”, apenas 3 registros, que representa aplicação química e metalúrgica, cujas subclasses patenteadas foram C07D e C07K.

Ilustração 5 – Patentes depositadas no EPO, WIPO, USPTO e INPI por código de classificação internacional.



Dentre as combinações realizadas, houve uma prevalência dos termos “*liposome and Alzheimer*” (30 resultados) e “*liposome and Parkinson*” (23 resultados). Observa-se assim, que se tratam de lipossomas para prevenção ou tratamento de duas doenças neurodegenerativas cujas causas parecem estar relacionadas tanto a fatores hereditários quanto a fatores relacionados ao estresse oxidativo (YAN et al., 2013).

CONCLUSÃO

Diante da pesquisa realizada, foi possível observar que embora o número de patentes tenha aumentado nos últimos anos, ainda são poucas as patentes de lipossomas para tratamento de doenças relacionadas com sistema nervoso central (ansiedade, depressão, esquizofrenia, Parkinson, Alzheimer e epilepsia). Nas consultas realizadas não foram encontradas patentes brasileiras, o que demonstra que o país ainda precisa aumentar o desenvolvimento de pesquisas e inovação na área de nanotecnologia farmacêutica. Assim, faz-se necessário incentivar o desenvolvimento de pesquisas voltadas a aplicação de lipossomas para o tratamento e a prevenção de doenças do sistema nervoso central, visto que estas têm afetado um maior número de pessoas nos últimos anos.

REFERÊNCIAS

ALZHEIMER ASSOCIATION, 2014. Alzheimer Association 2014 Alzheimer`s disease facts and figures. **Alzheimer`s Dementia**, v. 10, p. 47-92, 2014.

ANDERSEN, N.C.; CARPENTER JR., W.T.; KANE, J.M.; LASSER, R.A.; MARDER, S.R.; WEINBERGER, D.R. Remission in schizophrenia: proposed criteria and rationale for consensus. **The American Journal of Psychiatry**, v. 162, n. 3, p. 441-449, 2005.

BATISTA, C.M.; CARVALHO, C.M.B.; SANTOS - MAGALHÃES, N.S. Lipossomas e suas aplicações terapêuticas: Estado da arte. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.43, n. 2, pp.167–179, 2007.

BEKIRIS, L.M.; YU, C.; BIRD, T.D.; TSUANG, D.W. Review Article: Genetics of Alzheimer Disease. **Journal of Geriatric Psychiatry Neurology**, v. 23, n. 4, p. 213-227, 2010.

CARLBORG, A.; WINNERBACK, K.; JONSSON, E.G.; JOKINEN, J.; NORDSTROM,P. Suicide in schizophrenia. *Expert. Rev. Neuroher*, v. 10, n. 7, p. 1153 – 1164, 2010.

CERN, A.; GOLBRAIKH, A.; SEDYKH, A.; TROPSHA, A.; BARENHOLZ, Y.; GOLDBLUM, A. Quantitative structure - property relationship modeling of remote liposome loading of drugs. **Journal of Controlled Release**, v. 160, p. 147-157, 2012

EATON, W.W.; MARTINS, S.; NESTADT, G.; BIENVENU, J.; CLARKE, D.; ALEXANDRE, P. The burden of mental disorders. **Epidemiological reviews**, v. 30, p. 1- 14, 2008.

FERNANDES, Maria José da Silva. Epilepsia do lobo temporal: mecanismos e perspectivas. **Estudos avançados**. v. 27, n. 77, p. 85-98, 2013.

KUMAR, N.; KUMAR,; R. Nanomedicine for neurological disorder. In: **Nanotechnology and nanomaterials in the of life-threatening diseases**. William Andrew, p. 109-175, 2014.

LORA, A.; KOHN,R.; LEVAV, I.; McBAIN, R.; MORRIS, J.; SAXENA, S. Service availability and utilization and treatment gap for schizophrenic disorders: a survey in 50 low- and middle-income countries. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 90, p. 47-54, 2012

MANCOPES, R.; BUSANELLO-STELLA, A.R.; FINGER, L.S.; NEU, A.P.; PACHECO, A. B.; TORRIANI, M. S. Influência da levodopa sobre a fase oral da deglutição em pacientes com doença de Parkinson. **Revista CEFAC**,v. 15, n. 3, p. 707-712, 2013.

MARCHARETTI, R.L.; CASTRO, A.P.W.; KURCGANT, D.; CREMONENSE,E.; NETO, J.G. Transtornos mentais associados à epilepsia. **Revista de Psiquiatria Clínica**, v. 32, p.170-182, 2005.

MEYER, A.C.; DUA, T.; MA, J.; SAXENA, S.; BIRBECKD, G. Global disparities in the epilepsy treatment gap: a systematic review. **Bull World Health Organ**, v. 88, p. 60- 266, 2010.

MILLIER, A.; SCHIMIDT, U.; ANGERMEYER, M.C.; CHAUHAN, D.; MURTHY, V. TOUMI, M.; CADI-SOUSSI, N. Humanistic burden in schizophrenia: A literature review, **Journal of Psychiatric Research**, v.54, p. 85-93, 2014.

MORENO, L. C. G. A. I.; OLIVEIRA, G. Z. S.; CAVALCANTI, I. M. F.; SANTOS-MAGALHÃES, N. S.; ROLIM, H. M. L.; FREITAS, R. M. Development and evaluation of liposomal formulation containing nimodipine on anxiolytic activity in mice. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 116, p.64-68, 2014.

RIBEIRO, E. M.; DANTAS, C.C.B.; MEDEIROS, A.C.C.; ARRUDA, A.P.; CARVALHO, M.D.F. Bases genéticas da doença de Parkinson. **Revista Brasileira de Medicina**, v. 61, n.6, p. 388-98, 2004.

ROMANINI, C.V.; MACHADO, M.W.; BIAVATTI, M.W.; OLIVEIRA, M.W. Avaliação da atividade ansiolítica e antidepressiva do extrato fluido e fração aquosa de folhas de Passiflora alata Curtis em camundongos. **Acta Scientiarum Health Science**, v. 28, n. 2, p. 159-164, 2006.

TEIXEIRA, L. P. Prospecção tecnológica: importância, métodos e experiências da Embrapa Cerrados. **Documentos 317**, Planaltina, DF, 34p. 2013

VAN OS, J.; BURNS, T.; CAVALLARO, R.; LEUCHT, S.; PEUSKENS, J.; HELLDIN, L.; BERNARDO, M.; ARANGO, C.; FLEISCHHACKER, W.; LACHAUX, B.; KANE, J.M. Standardized remission criteria in schizophrenia. **Acta Psychiatrica Scandinavica**, v. 113, n. 2, p.91- 95, 2006.

VIEIRA, V.M.M., OHAYON, P. Inovação em fármacos e medicamentos: estado-da-arte no Brasil e políticas de P & D. **Revista Economia & Gestão** 2007, v.6, n. 13 p. 1-23, 2007.

WIPO. PCT – **The International Patent System**. Disponível em: <<http://www.wipo.int/pct/en/faqs.html>>. Acesso em: 21/04/2014.

WHO-World Health Organization. Factsheet – Depression, 2005. Disponível em: <http://www.who.int/mental_health/management/depression/definition/en>. Acesso em: 26 abr. 2006.

WONG, H.L.; WU, X.Y.; BENDAYAN, R. Nanotechnological advances for the delivery of CNS therapeutics. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 64, p. 686-700, 2012

YAN, M; H.; WANG, X.; ZHU, X. Mitochondrial defects and oxidative stress in Alzheimer disease and Parkinson disease. **Free Radical Biology and Medicine**, v.62, p. 90 - 101, 2013.

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

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

RESUMO

Várias pesquisas demonstraram o envolvimento dos lipossomas, vesículas microscópicas compostas por uma ou mais camadas lipídicas, no aumento da eficácia antioxidante dos fármacos testados, protegem células do estresse oxidativo, reduzem a peroxidação lipídica e promovem melhor ativação de enzimas antioxidantes. Estudos anteriores realizado em nosso grupo, demonstraram que o uso de lipossomas contendo nimodipina (LCNa) apresenta efeito ansiolítico, antidepressivo e antiepiléptico, também foi sugerido um positivo potencial antioxidante dos lipossomas contendo nimodipina (LCNa) que foi demonstrado pela redução de íons nitritos, remoção de radicais hidroxila e de substâncias reativas com o ácido tiobarbitúrico. Dentro desta perspectiva o presente estudo traz a avaliação do potencial antioxidante *in vitro* da nimodipina (NMD) e de lipossomas contendo nimodipina por meio da eliminação do radical livre estável 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH), ácido 2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolína-6-sulfônico - ABTS, ânion superóxido (O_2^-) e potencial redutor. Os estudos realizados demonstraram moderada capacidade antioxidante da nimodipina contra radical DPPH ($CE_{50} = 127,54$ nM), ABTS ($CE_{50} = 4,91$ nM), superóxido ($CE_{50} = 229,36$ nM) e potencial redutor ($CE_{50} = 183,59$ nM). Quando avaliada a capacidade antioxidante do LCNa nas mesmas condições experimentais que a nimodipina, foi observado maior efeito antioxidante com o valor da CE_{50} de 0,19 nM para o radical DPPH * , 0,052 nM para o radical ABTS $^{*+}$, 0,949 nM para o radical superóxido e 2,35 nM para o potencial redutor. Assim, foi demonstrado que LCNa melhorou a capacidade antioxidante da nimodipina, o que pode estar relacionado a uma maior solubilidade do fármaco e ao consequente aumento da interação com os radicais testados.

Palavras-chave: ABTS, DPPH, Lipossomas, Nimodipina, Potencial redutor, Superóxido.

INTRODUÇÃO

As espécies reativas de oxigênio (EROS), tais como superóxido, peróxido de hidrogênio e radicais hidroxila são gerados como subprodutos naturais do metabolismo de oxigênio (SAEIDNIA et al., 2013). No entanto, estes radicais livres (RL) são potencialmente capazes de criar dano oxidativo através da interação com moléculas biológicas (ROCHA et al., 2011). A geração de radicais livres e/ou espécies reativas não radicais é resultante do metabolismo de oxigênio. A mitocôndria, por meio da cadeia transportadora de elétrons, é a principal fonte geradora (BARBOSA et al., 2010). Os RL são compostos altamente reativos por possuírem um elétron não-pareado na órbita mais externa, que podem conduzir a uma série de danos celulares ao organismo (VANCINI et al., 2005).

O desequilíbrio entre as espécies reativas de oxigênio nocivas (EROS) e as defesas antioxidantes provoca estresse oxidativo, o que resulta em dano oxidativo. No cérebro, quando o equilíbrio é perdido, o estresse oxidativo causa sérios danos que levam à perda neuronal, em consonância com doenças neurodegenerativas. As EROS podem causar quebra de ácidos nucleicos, inativação de enzimas, despolimerização polissacarídica, peroxidação lipídica e uma série de outros processos destrutivos. Em geral, EROS danificam todas as biomoléculas, levando à morte celular (YAN et al., 2013).

O estresse oxidativo é uma das principais causas de desordens degenerativas, incluindo a isquemia cerebral, a doença de Alzheimer (DA), a doença de Parkinson (DP) e a doença de Huntington (KIM et al., 2014).

Os lipossomas são vesículas microscópicas compostas de uma ou mais bicamadas lipídicas concêntricas, separadas por um meio aquoso. Eles podem encapsular substâncias hidrofílicas e /ou lipofílicas, servem como carreadores de fármacos, biomoléculas ou agentes de diagnóstico (BATISTA et al., 2007). Os lipossomas possuem inúmeras vantagens em relação a outras formas farmacêuticas, dentre as quais estão a alta especificidade, que permite o exercício de sua atividade farmacológica, com diminuição de efeitos secundários, são vetores medicamentosos, pois conseguem atingir um alvo bem determinado e até mesmo receptores celulares específicos, tornando-se menos tóxicos (CUNHA, et al., 2007).

Várias pesquisas demonstraram o envolvimento dos lipossomas no aumento da eficácia antioxidante dos fármacos testados, protegem células do estresse oxidativo (RENGEL et al., 2005), reduzem a peroxidação lipídica (TIAN et al., 2007) e promoção de melhor ativação de enzimas antioxidantes (PENG et al., 2010).

O aumento dos níveis de Ca^{2+} pode ativar lipases e proteases, com consequente degradação de fosfolipídios e produção de prostaglandinas envolvidas na produção de espécies reativas de oxigênio. A nimodipina (NMD), bloqueadora dos canais de cálcio, tem demonstrado benefícios em muitos distúrbios do sistema nervoso central, como isquemia cerebral, acidente vascular cerebral, epilepsia, demência e doença degenerativa relacionada à idade. Também foi demonstrada ação protetora em modelos experimentais de isquemia cerebral. Além disso, NMD demonstrou neuroproteção contra neurotoxicidade *in vivo* induzida por glutamato (GOTZ et al., 1994, AMBHOE et al., 2014). Estudo anterior realizado em nosso grupo, sugeriu um positivo potencial antioxidante de lipossomas contendo nimodipina (LCNa) que foi demonstrado pela redução de radicais nitritos, remoção de radicais hidroxila e de substâncias reativas com o ácido tiobarbitúrico (OLIVEIRA, 2013).

Neste sentido, o objetivo deste estudo foi avaliar a capacidade antioxidante *in vitro* de uma formulação lipossomal contendo nimodipina (LCNa) por meio da eliminação do radical livre estável, 2,2 – difenil – 1 – picrilhidrazil (DPPH), 2,2`- azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico (ABTS), superóxido e pelo potencial redutor ($\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$).

MATERIAL E MÉTODOS

Preparação da formulação lipossomal de nimodipina (LCNa)

Os lipossomas contendo nimodipina (LCNa) foram preparados utilizando o método da hidratação do filme lipídico seguido de sonicação como descrito em Moreno e colaboradores (2014). Os lipossomas foram produzidos sem carga, utilizando como lipídios a fosfatidilcolina de soja e o colesterol (proporção de 8:2), além de 10 mg de nimodipina para a obtenção de uma formulação lipossomal com concentração lipídica de 117,6 mM e concentração do fármaco de 1,0 mg/mL. Esses constituintes foram solubilizados em uma mistura de clorofórmio: metanol (3:1 v/v), sob agitação magnética. Os solventes foram removidos por evaporação à vácuo, utilizando o rotaevaporador por 60 min (37 ± 1 ° C, 80 rpm), resultando na formação de um filme lipídico. Este filme foi hidratado com 10 mL de solução tampão fosfato pH 7,4 produzindo assim vesículas multilamelares grandes. Por fim, a suspensão lipossomal foi submetida à sonicação por sonda ultrassônica (Vibra Cell, BRANSON, EUA) a 200 W e 40 Hz por 300 s para a obtenção de lipossomas unilamelares pequenos.

Avaliação da capacidade antioxidante contra o radical DPPH[•]

Para avaliação da capacidade antioxidante contra o radical DPPH[•] foi utilizada a metodologia descrita por Oliveira e colaboradores (2014). Resumidamente, uma mistura reacional do lipossomas contendo nimodipina (LCNa) em várias concentrações (2,15; 4,30; 8,60; 12,90 e 17,20 nM) e o radical DPPH[•] (100 µM) foi agitada vigorosamente e incubada a temperatura ambiente na ausência de luz (no escuro) durante 30 minutos (**Ilustração 1**). A avaliação antioxidante foi realizada em triplicata e os valores das absorbâncias (517 nm) foram expressos como porcentagem de inibição do radical DPPH[•] pela seguinte equação:

$$\% \text{ de inibição} = \{(A_{\text{controle}} - A_{\text{mistura reacional}}) \times 100\} / A_{\text{controle}}$$

na qual, A_{controle} é a absorbância inicial da solução etanólica de DPPH[•] e $A_{\text{mistura reacional}}$ é a absorbância da mistura reacional contendo radical DPPH[•] e as concentrações do LCNa. A concentração efetiva (CE_{50}) do LCNa necessária para inibir o radical DPPH[•] em 50% a 517 nm foi determinada. O mesmo procedimento experimental foi utilizada para o nimodipina livre (2,15; 4,30; 8,60; 12,90 e 17,20 nM) e para o controle positivo Trolox 559 nM.

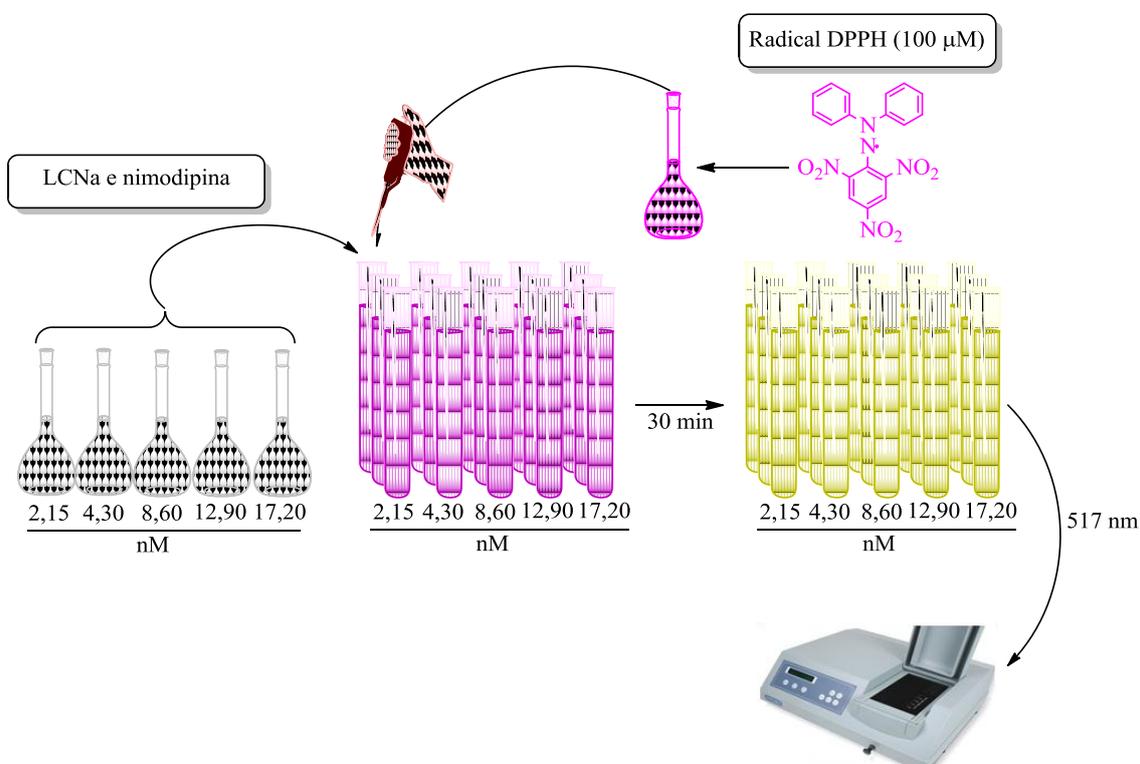


Ilustração 1. Avaliação da capacidade antioxidante do LCNa e da nimodipina pelo método DPPH[•].

Avaliação da capacidade antioxidante contra o radical ABTS^{•+}

Para avaliação da capacidade antioxidante contra o radical ABTS^{•+}, foi utilizada a metodologia descrita por Oliveira e colaboradores (2014). Inicialmente foi formado o cátion radical ABTS^{•+} a partir da reação de 5 mL de uma solução 7 mM de ABTS^{•+} com 88 µL de uma solução 2,45 mM de persulfato de potássio (K₂S₂O₈), incubada à temperatura ambiente e na ausência de luz por 16 horas. Transcorrido esse tempo, a solução de ABTS^{•+} foi diluída em etanol até obter uma solução com absorvância de 1,00 (± 0,05), a 734 nm (**Ilustração 2**). Em ambiente escuro a temperatura ambiente, foi feita uma mistura reacional contendo LCNa (2,15; 4,30; 8,60; 12,90 e 17,20 nM) e 1960 µL do radical ABTS^{•+}. O experimento foi realizado em triplicata e as leituras das absorvâncias foram realizadas no tempo de 6 minutos em um espectrofotômetro a 734 nm. Os resultados foram expressos como porcentagem de inibição do radical ABTS^{•+} pela seguinte equação:

$$\% \text{ inibição} = \{(A_{\text{controle}} - A_{\text{mistura reacional}}) \times 100\} / A_{\text{controle}}$$

na qual, A_{controle} é a absorvância inicial da solução etanólica de ABTS^{•+} e $A_{\text{mistura reacional}}$ é a absorvância da mistura contendo o radical ABTS^{•+} e as concentrações do LCNa. A concentração efetiva (CE₅₀) do LCNa necessária para reduzir a absorvância do radical ABTS^{•+} em 50% a 734 nm foi determinada. O mesmo procedimento experimental foi utilizada para o nimodipina não encapsulada (2,15; 4,30; 8,60; 12,90 e 17,20 nM) e para o controle positivo Trolox 559 nM.

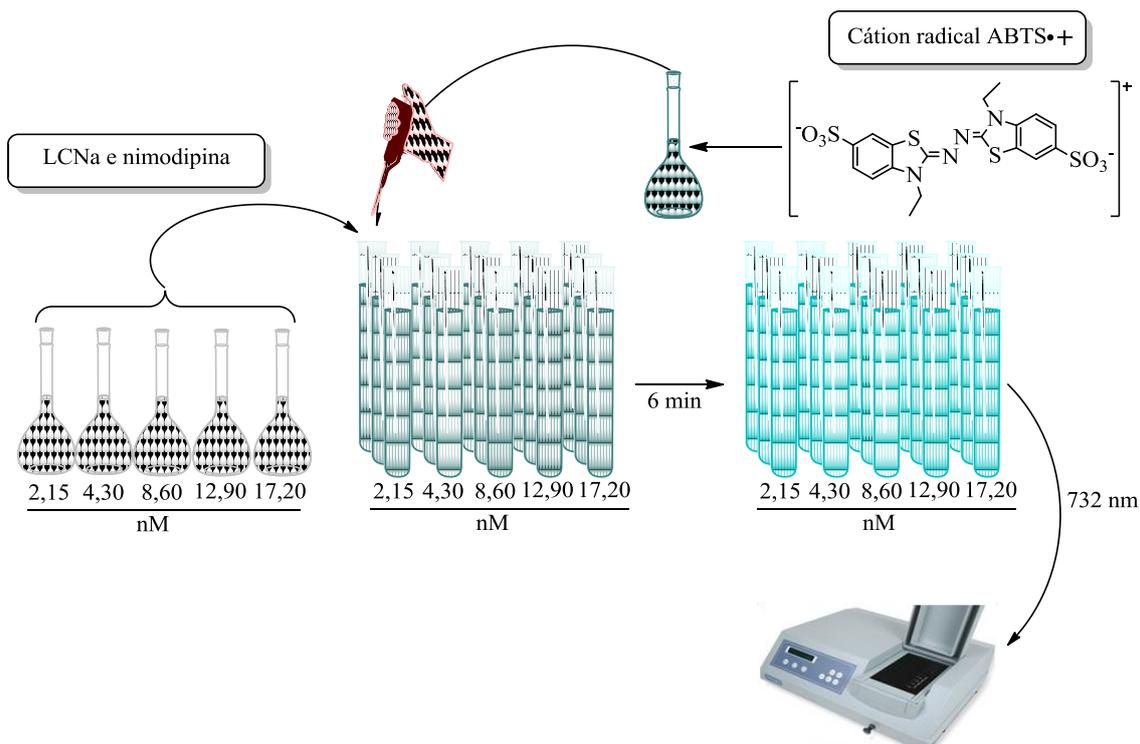


Ilustração 2. Avaliação da capacidade antioxidante do LCNa e nimodipina pelo método ABTS^{•+}.

Avaliação da capacidade antioxidante contra o radical superóxido (O₂^{•-})

Para avaliação da capacidade antioxidante contra o radical superóxido gerado pela auto-oxidação do Pirogalol, foi utilizada a metodologia descrita por Li (2013), com modificações. Resumidamente, várias concentrações do LCNa (2,15; 4,30; 8,60; 12,90 e 17,20 nM) foi misturado com 1460 µL de tampão Tris-HCl (0,05 mol/L, pH 7,4) contendo EDTA (1 mmol/L) e adicionado 40 µL de pirogalol (60 mmol/L em 1 mmol/L de HCl). A mistura reacional foi ligeiramente agitada e a absorbância em triplicata mensurada a 325 nm contra o tampão de Tris-HCl durante 5 minutos (**Ilustração 3**). Os resultados foram expressos como porcentagem de inibição da produção de radical superóxido pela seguinte equação:

$$\% \text{ de inibição} = \{(A_{\text{controle}} - A_{\text{mistura reacional}}) \times 100\} / A_{\text{controle}}$$

na qual, A_{controle} corresponde a mudança da absorbância no sistema de geração de radicais superóxido pela auto-oxidação do pirogalol (100 % de radical superóxido) sem LCNa e $A_{\text{mistura reacional}}$ corresponde a mudança da absorbância contendo as concentrações do LCNa. A concentração efetiva (CE₅₀) do LCNa necessário para inibir a produção de radical superóxido em 50% a 325 nm foi determinada. O mesmo procedimento experimental foi utilizado para o

nimodipina livre (2,15; 4,30; 8,60; 12,90 e 17,20 nM) e para o controle positivo Trolox 559 nM.

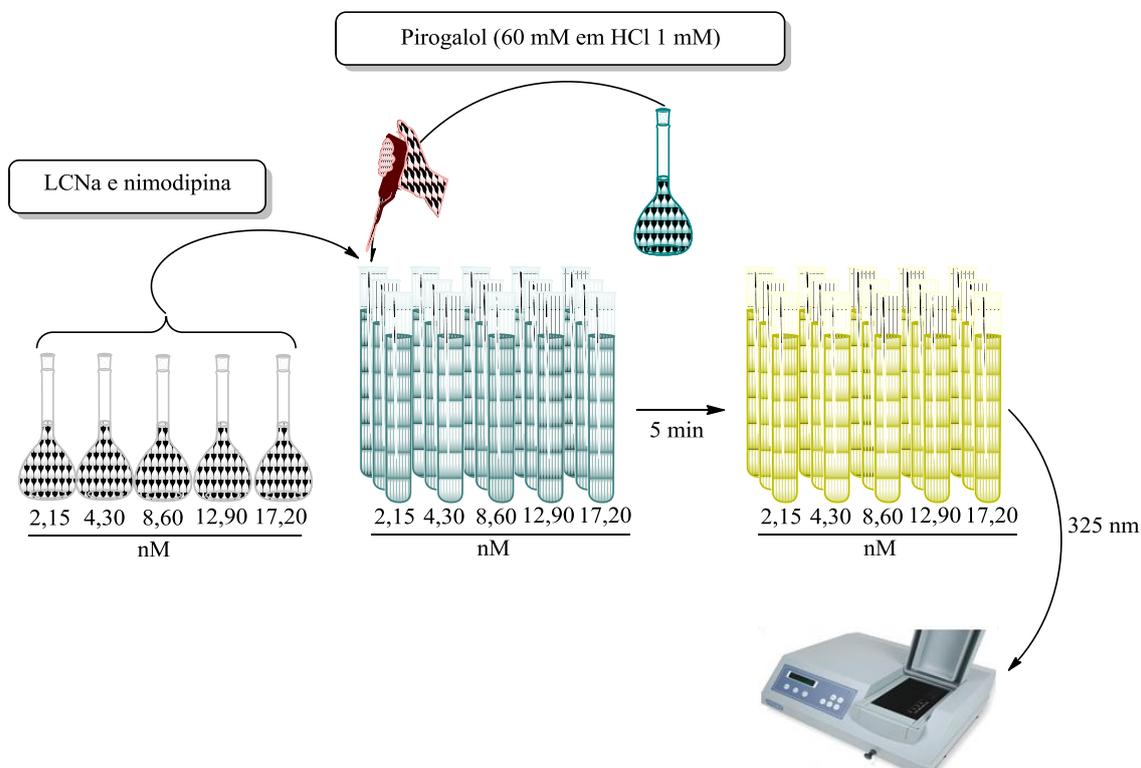


Ilustração 3. Avaliação da capacidade antioxidante do LCNa e nimodipina pelo método do radical superóxido.

Avaliação do Potencial Redutor

Para avaliação do potencial redutor, foi utilizada a metodologia descrita por Singhal e colaboradores (2011), com modificações. Resumidamente, foi preparado uma mistura reacional contendo várias concentrações do LCNa (2,15; 4,30; 8,60; 12,90 e 17,20 nM), 0,5 mL de ferricianeto de potássio 1% e 0,5 mL de tampão fosfato de sódio (0,2 M, pH 6.6). A mistura reacional foi incubada a 50 °C durante 20 minutos, seguido pela adição de 0,5 mL de ácido tricloroacético 10%, 0,5 ml de água destilada e 0,125 mL de cloreto férrico (FeCl_3) 0,1%. A absorbância da mistura reacional foi mensurada a 700 nm contra branco que continham apenas tampão fosfato (**Ilustração 4**). A concentração do LCNa que proporcionou um aumento de 0,5 da absorbância (CE_{50}) foi calculada. O mesmo procedimento experimental foi utilizado para o nimodipina não encapsulada (2,15; 4,30; 8,60; 12,90 e 17,20 nM) e para o controle positivo Trolox 559 nM.

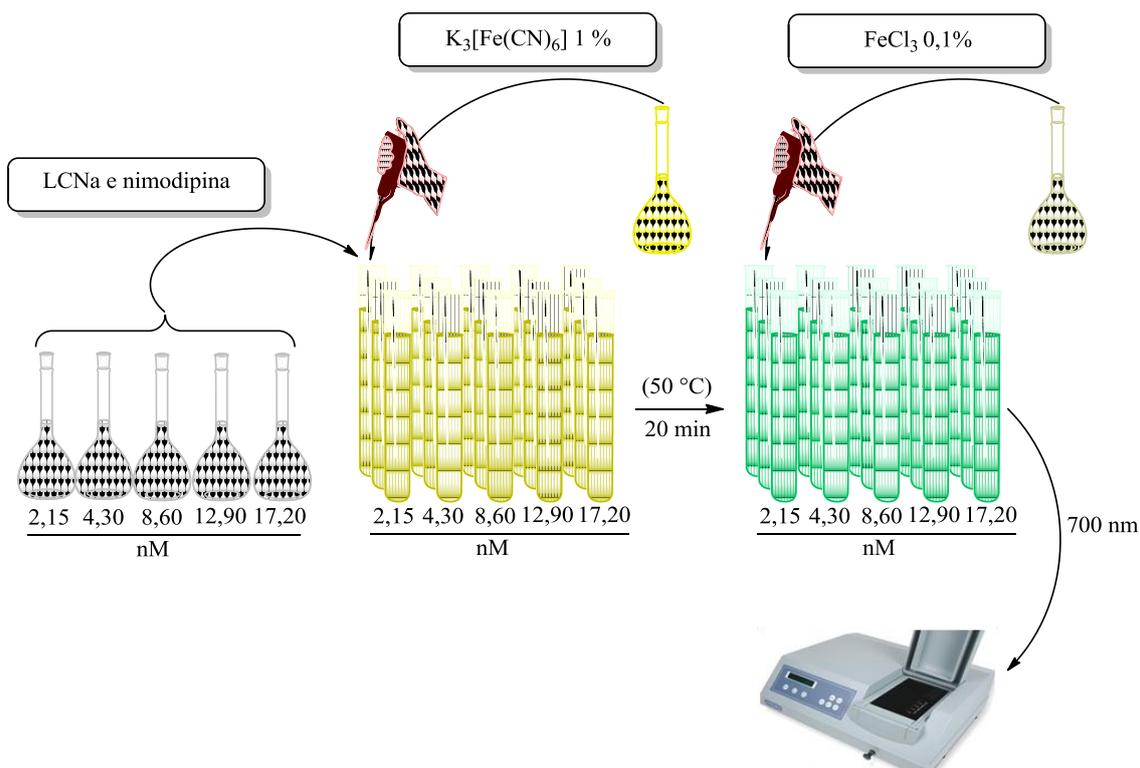


Ilustração 4. Avaliação do potencial redutor do LCNa e nimodipina.

2.5 Análise estatística

Todos os resultados foram apresentados como média \pm erro padrão da média (E.P.M). Análise estatística foi realizado utilizando *one way* ANOVA, seguido pelo teste *Newman – Keuls* como *post hoc* teste. Os resultados foram considerados estatisticamente significante quando $p < 0,05$. Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando *GraphPad Prism* 6.02 (San Diego, CA, USA). Os valores antioxidantes in vitro da CE_{50} foram obtidos por regressão linear utilizando o software *GraphPad Prism* 6.02 (*GraphPad*, Inc., Califórnia, EUA).

RESULTADOS

Capacidade antioxidante contra o radical DPPH[•]

Os valores da capacidade antioxidante do LCNa contra o radical DPPH[•] nas concentrações de 2,15; 4,30; 8,60; 12,90 e 17,20 nM foram de $74,21 \pm 1,24$; $78,19 \pm 0,49$; $81,90 \pm 0,70$; $86,04 \pm 0,52$ e $88,70 \pm 0,10\%$, respectivamente, a qual reduziu a concentração

da solução de radical DPPH[•], sistema, ($p < 0,05$) (**Ilustração 5**). Nas mesmas condições experimentais, a nimodipina não encapsulada em lipossomas nas concentrações de 2,15; 4,30; 8,60; 12,90 e 17,20 nM reduziu a solução de radical DPPH[•], apresentando capacidade antioxidante de $25,71 \pm 0,84$; $30,03 \pm 2,27$; $33,94 \pm 3,82$; $33,26 \pm 0,35$ e $39,23 \pm 1,50\%$, respectivamente. O Trolox 559 nM também reduziu o radical DPPH[•] ($p < 0,05$), apresentando $88,56 \pm 0,72\%$ de capacidade antioxidante (**Ilustração 5**). De acordo com os resultados da capacidade antioxidante na inibição do radical DPPH[•], o valor da CE_{50} foi de 0,19 nM para o LCNa e de 127,54 nM para nimodipina livre.

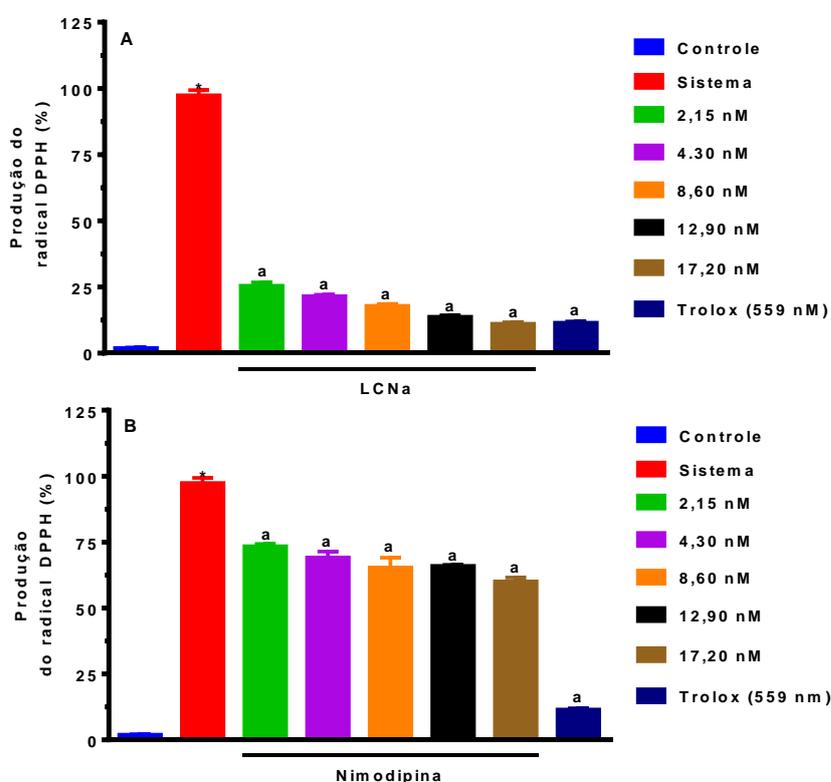


Ilustração 5: Capacidade antioxidante do LCNa (a) em diferentes concentrações (0,56 – 4,65 nM) e da nimodipina (b) em diferentes concentrações (2,15 nM – 17,20 nM) na inibição da produção radical DPPH[•]. Os valores representam a média \pm E.P.M. dos valores de inibição *in vitro*, $n = 3$, dos experimentos em duplicata. * $p < 0,05$ versus controle (Tween 80 0,05% dissolvido em solução salina 0,9%) (ANOVA Neuman-Keuls como *post hoc* teste); ^a $p < 0,001$ em relação ao sistema (solução de radical DPPH[•]) (ANOVA Neuman-Keuls como *post hoc* teste).

Capacidade antioxidante contra o radical ABTS^{•+}

Os resultados antioxidantes correspondentes à inibição do radical ABTS^{•+} pela LCNa e nimodipina em diferentes concentrações estão representados na **Ilustração 6**. Os valores da capacidade antioxidante da LCNa nas concentrações de 2,15; 4,30; 8,60; 12,90 e 17,20 nM foram de $84,63 \pm 0,20$; $86,71 \pm 1,79$; $90,49 \pm 0,30$; $93,10 \pm 0,30$ e $94,14 \pm 0,46\%$, respectivamente, na qual reduziu a concentração da solução de radical ABTS^{•+} (Sistema) ($p < 0,05$). Nas mesmas condições experimentais, a nimodipina nas concentrações de 2,15; 4,30; 8,60; 12,90 e 17,20 nM reduziu a solução de radical ABTS^{•+} apresentando capacidade antioxidante de $37,44 \pm 1,04$; $44,41 \pm 1,11$; $55,78 \pm 2,98$; $70,21 \pm 1,33$ e $80,82 \pm 0,98\%$, respectivamente. O Trolox (559 nM) também reduziu a solução de radical ABTS^{•+} apresentando $91,80 \pm 0,38\%$ de capacidade antioxidante ($p < 0,05$) (**Ilustração 6**). De acordo com os resultados da capacidade antioxidante na inibição do radical ABTS^{•+}, o valor da CE₅₀ foi de 0,052 nM para o LCNa e de 4,91 nM para nimodipina não encapsulada em lipossomas.

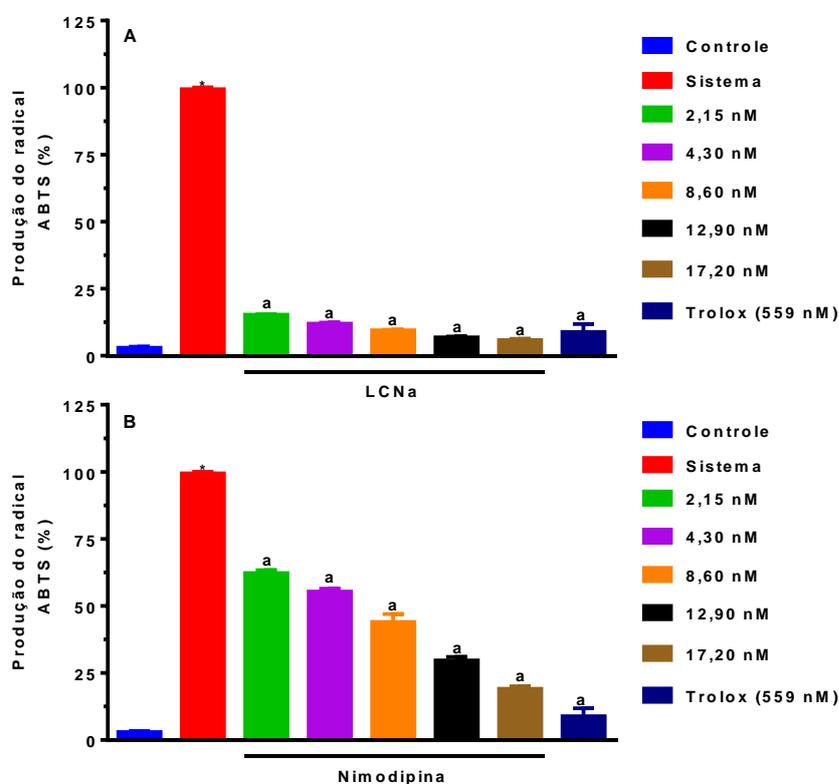


Ilustração 6: Capacidade antioxidante do LCNa (a) em diferentes concentrações (2,15 nM – 17,20 nM) e da nimodipina (b) em diferentes concentrações (2,15 nM – 17,20 nM) na inibição do radical ABTS^{•+}. Os valores representam a média \pm E.P.M. dos valores de inibição *in vitro*,

n = 3, dos experimentos em duplicata. * p<0,05 versus controle (Tween 80 0,05% dissolvido em solução salina 0,9%) (ANOVA e *Neuman-Keuls* como *post hoc* teste); ^a p<0,05 em relação ao sistema (solução de radical ABTS•+) (ANOVA *Neuman-Keuls* como *post hoc* teste).

Capacidade antioxidante contra o radical superóxido (O₂^{•-})

Os resultados antioxidantes correspondente a inibição do radical superóxido pela LCNa e nimodipina em diferentes concentrações estão representados na **Ilustração 7**. Os valores da capacidade antioxidante da LCNa nas concentrações de 2,15; 4,30; 8,60; 12,90 e 17,20 nM foram de 61,76 ± 0,23; 64,36 ± 0,58; 70,43 ± 0,34; 77,13 ± 1,09 e 82,1 ± 0,41%, respectivamente, na qual inibiu os radicais superóxido gerado pela auto-oxidação do pirogalol (p<0,05). Nas mesmas condições experimentais, a nimodipina não encapsulada nas concentrações de 2,15; 4,30; 8,60; 12,90 e 17,20 nM reduziu os radicais superóxido apresentando capacidade antioxidante de 18,26 ± 0,20, 21,46 ± 0,86, 24,60 ± 1,00, 28,20 ± 0,75 e 31,5 ± 0,56%, respectivamente. O Trolox (559 nM) também reduziu a produção dos radicais superóxido apresentando 75,86 ± 1,58% de capacidade antioxidante (p<0,05) (**Ilustração 7**). De acordo com os resultados da capacidade antioxidante na inibição do radical superóxido, o valor da CE₅₀ foi de 0,949 nM para o LCNa e de 229,36 nM para nimodipina.

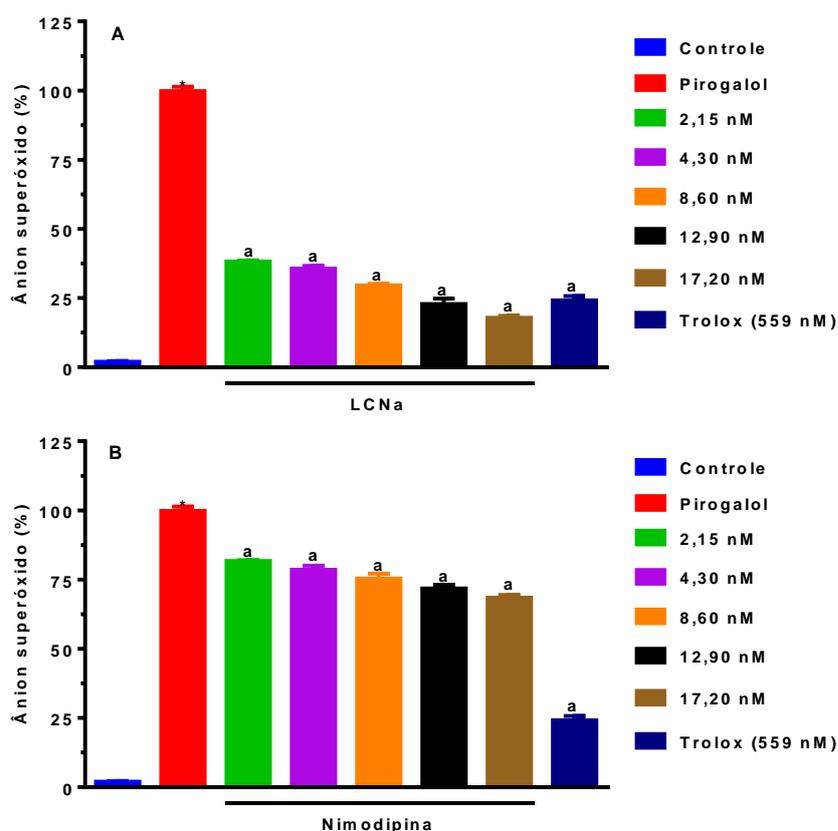


Ilustração 7: Capacidade antioxidante do LCNa (a) em diferentes concentrações (2,15 – 17,20 nM) e da nimodipina (b) em diferentes concentrações (2,15 – 17,20 nM) pela remoção de radicais superóxido produzido pela auto-oxidação do Pirogalol (60 mM). Os valores representam a média \pm E.P.M. dos valores de inibição *in vitro*, $n = 3$, dos experimentos em duplicata. * $p < 0,05$ versus controle (ANOVA *Neuman-Keuls* como *post hoc* teste); ^a $p < 0,05$ em relação a auto-oxidação do Pirogalol (ANOVA e *Neuman-Keuls* como *post hoc* teste).

Potencial Redutor

O resultado correspondente a capacidade antioxidante do LCNa e nimodipina pelo seu potencial redutor em diferentes concentrações estão representados na **Ilustração 8**. O aumento da absorbância em 700 nm nas concentrações de 2,15; 4,30; 8,60; 12,90 e 17,20 nM demonstra o potencial redutor do LCNa e nimodipina em relação ao controle ($p < 0,05$). O Trolox (559 nM) também apresentou uma elevação do potencial redutor em relação ao controle ($p < 0,05$). De acordo com esses resultados, os valores da CE_{50} do LCNa e nimodipina necessárias para reduzir ferricianeto de potássio (Fe^{3+}) à ferrocianeto de potássio (Fe^{2+}) em 50% da sua absorbância inicial foi de 2,35 nM e 183,59 nM, respectivamente.

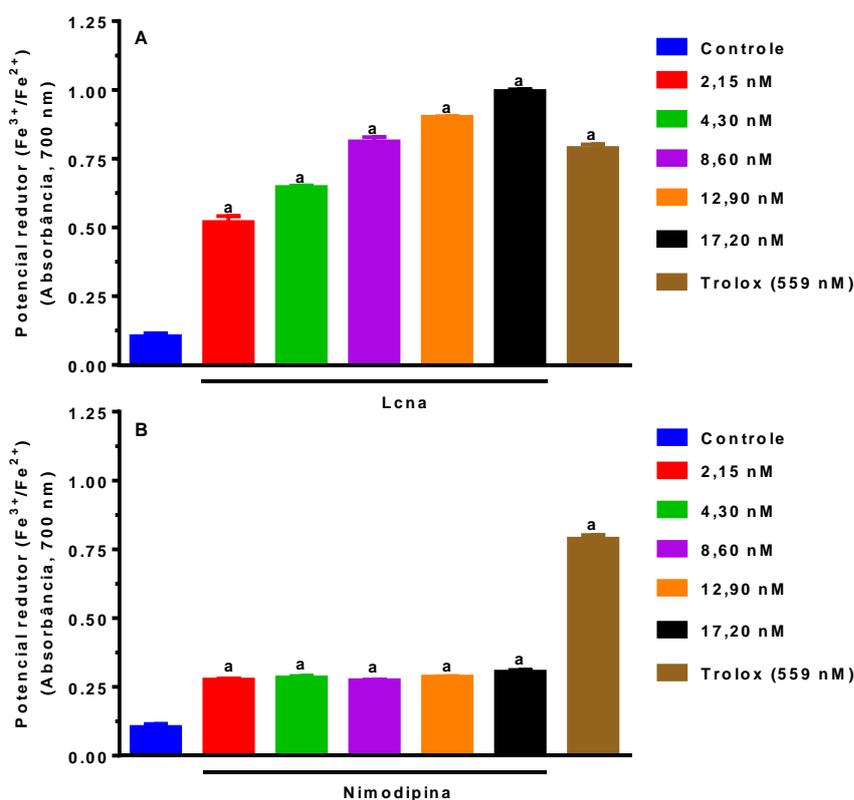


Ilustração 8: Potencial redutor ($\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$) do LCNa e da nimodipina. Os valores representam a média \pm E.P.M. das absorvâncias em 700 nm, $n=3$, dos experimentos em duplicata. O Trolox 559 nM foi usado como padrão antioxidante. ^a $p<0,05$ em relação ao controle (ANOVA e *Neuman-Keuls* como *post hoc* teste).

DISCUSSÃO

No método que envolve o sequestro do radical livre estável DPPH^{\bullet} , a capacidade antioxidante é analisada pela diminuição da absorvância da solução de DPPH^{\bullet} a 517 nm, na qual o radical DPPH^{\bullet} de cor púrpura é reduzido para formar DPPH_2 de cor amarela (MISHRA; OJHA; CHAUDHURY, 2012). Com base neste princípio, o resultado obtido no presente estudo demonstrou que a LCNa apresenta elevada capacidade antioxidante em relação a nimodipina. Quando ambos resultados são comparados, é possível observar um aumento da capacidade antioxidante da LCNa contra o radical DPPH^{\bullet} de 65,35; 61,59; 58,56; 61,43; 55,77% nas concentrações de 2,15; 4,30; 8,60; 12,90 e 17,20 nM, respectivamente. Quando os resultados são comparados com o Trolox, a LCNa na concentração de 17,20 nM apresentou capacidade antioxidante superior ao Trolox com uma concentração 32 (trinta e duas) vezes maior. Apresentando elevada capacidade antioxidante, a CE_{50} do LCNa foi 0,19

nM, sendo esse valor onze vezes menor que a concentração de 2,15 nM, indicando que a LCNa em baixas concentrações é um potente antioxidante.

O radical $ABTS^{•+}$ produzido por meio da oxidação da solução de $ABTS^+$ pelo persulfato de potássio apresenta coloração azul/verde e a reação com um composto antioxidante é monitorada pela diminuição da absorbância da reação a 734 nm. Desta forma, o presente estudo demonstrou que o LCNa em baixas concentrações é um potente antioxidante pela inibição do radical $ABTS^{•+}$. Como observado na Ilustração 6, a capacidade antioxidante foi dependente da concentração e quando os resultados são comparado com a nimodipina, é possível observar um aumento da capacidade antioxidante da LCNa contra o radical $ABTS^{•+}$ de 55,76; 48,73; 38,35; 24,58 e 14,14% nas concentrações de 2,15; 4,30; 8,60; 12,90 e 17,20 nM, respectivamente. Em relação ao Trolox, a LCNa na concentração de 12,90 nM ($93,10 \pm 0,30\%$) apresentou capacidade antioxidante 1,39 % melhor que o Trolox ($91,80 \pm 0,38\%$) e na concentração de 17,20 nM ($94,14 \pm 0,46\%$), foi 2,48% mais eficiente na inibição do radical $ABTS^{•+}$. Consequentemente, esse resultado antioxidante apresentado pelo LCNa resultou na CE_{50} de 0,012 nM, sendo esse valor 46,6 vezes inferior que a menor concentração avaliada.

A auto-oxidação do pirogalol resulta na mudança de cor da reação para amarelo e consequentemente aumenta a valor da absorbância a 325 nm, indicando que há produção de radical superóxido (XU et al., 2013). Dessa forma, quando um composto antioxidante é adicionado a mistura e reage com os radicais superóxido gerado, há uma diminuição dos valores da absorbância a 320 nm. O princípio desta reação foi utilizado nesta avaliação antioxidante e de acordo com o resultado obtido, a LCNa pode ser considerado um potente sequestrador de radicais superóxidos. Como observado na **Ilustração 7**, a capacidade antioxidante pela diminuição de radicais superóxido foi dependente da concentração e quando os resultados são comparado com a nimodipina nas mesmas condições experimentais, é possível observar um aumento da capacidade antioxidante da LCNa contra o radical superóxido de 70,43; 66,65; 65,07; 63,43; 58,00 e 61,63% nas concentrações de 2,15; 4,30; 8,60; 12,90 e 17,20 nM, respectivamente. Em relação ao Trolox, a LCNa foi mais eficiente na diminuição da concentração de radicais superóxido a partir da concentração de 12,90 nM ($77,13 \pm 1,09\%$). A elevada capacidade antioxidante da LCNa resultou na CE_{50} de 0,177 nM, sendo esse valor doze vezes inferior a menor concentração avaliada. O radical superóxido é uma EROs tóxicos que pode ser gerado em numerosas reações biológicas e apesar de ser um oxidante relativamente fraco, pode originar outras EROs mais reativas como o radical hidroxila. Inicialmente, esse resultado antioxidante pode ser bastante promissor, pois o radical superóxido é uma EROs tóxicos que pode ser gerado em numerosas reações biológicas e

apesar de ser um oxidante relativamente fraco, pode originar outras EROs mais reativas como o radical hidroxila.

O poder redutor da nimodipina e LCNa foram avaliados pela transformação do ferricianeto de potássio (Fe^{3+}) de cor amarela à ferrocianeto de potássio (Fe^{2+}) de cor verde. Essa mudança de cor ocorre por meio da capacidade de transferência de elétrons, na qual, serve como um importante indicador da capacidade antioxidante apresentado pela LCNa, como demonstrado anteriormente. Processos como eliminação de radicais livres e/ou inibição da peroxidação lipídica é mediada pela reação redox e de acordo com o resultado obtido no presente estudo (**Ilustração 8**), a LCNa apresentou elevado potencial redutor de acordo com o aumento da concentração, sendo esse resultado melhor do que apresentado pela nimodipina a partir da menor concentração avaliada e em relação ao Trolox (559 nM), a partir da concentração de 12,90 nM.

O principal mecanismo envolvido na capacidade antioxidante de um determinado composto estar relacionado transferência de elétrons ou átomos de hidrogênio (NIKI, 2010). Levando em consideração a capacidade antioxidante observada os testes realizados, foi proposto o possível mecanismo de ação antioxidante (**Ilustração 9**). A nimodipina pode doar dois hidrogênios radicalares, adquirindo caráter aromático no anel nitrogenado, transformando-se em pirimidina, substância heteroaromática de elevado grau de estabilidade (OLIVEIRA, 2013). Neste sentido, uma provável razão para a melhor atividade antioxidante da nimodipina encapsulada em lipossomas é devido ao aumento da solubilidade em água. O aumento do potencial de interação do fármaco ainda pode ser justificado pela sua reduzida superfície de contato, além da propriedade de liberação modificada do fármaco promovida pelo sistema lipossomal.

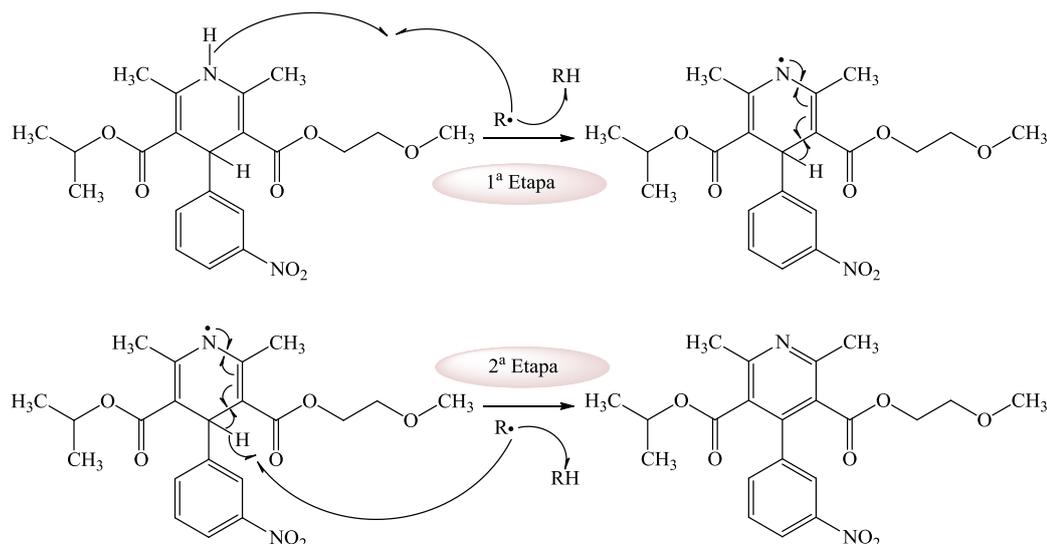


Ilustração 9: Possíveis mecanismos da ação antioxidante da nimodipina na neutralização do radical $R\cdot$ (DPPH \cdot , ABTS $^{+\cdot}$, $SO_2^{\cdot-}$).

CONCLUSÃO

A nimodipina lipossomal exibiu uma notável capacidade antioxidante contra os radicais DPPH, ABTS e superóxido, bem como capacidade de transferir elétrons. Quando esses resultados são comparados com a nimodipina não encapsulada em lipossomas, é observado um maior efeito antioxidante em menores concentrações.

REFERÊNCIAS

AMBHORE, N.S.; PRASANNA, M.; ANTONY, A.S.; SATISH KUMAR, M.N.; ELANGO, K. Pharmacological and anti-oxidant evaluation of Aspirin, nimodipine and its combination for anti-Parkinson's activity in MPTP induced rat model. **International Journal of Health & Allied Sciences**, v. 3, p. 14-22, 2014.

BARBOSA, K.B.F.; COSTA, N.M.B.; ALFENAS, R.D.C.G.; PAULA, S.O.; MINIM, V.P.R.; BRESSAN, J. Oxidative stress: concept, implications and modulating factors. **Revista de Nutrição**, v. 23, n. 4, p. 629-643, 2010.

BATISTA, C. M.; CARVALHO, C. M. B.; MAGALHÃES, N. S. S. Lipossomas e suas aplicações terapêuticas: Estado da arte. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 43, n. 2, p. 167-179, 2007.

CUNHA, T. N.; SOARES, I. C.; GASPARI, E. "Em busca de lipossomas inteligentes para administração de drogas para tuberculose." **BEPA – Boletim Epidemiológico Paulista**, São Paulo, v. 4, n. 39, 2007.

GOTZ, M.E; KUNING, G; RIEDERER, P., YOUDIM, M.B. Oxidative stress: Free radical production in neural degeneration. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 63, p. 37-122, 1994.

KIM, Y. N.; JUNG, H. QADFY.; EUMA, W. S.; KIM, D. W.; SHIN, M. J.; AHN, E. H.; KIM, S. J.; LEE, C. H.; YONG, J. I.; RYU, E. J.; PARK, J.; CHOI, J.H.; HWANG, I. K.; CHOI, S. Y. Neuroprotective effects of PEP-1-carbonyl reductase 1 against oxidative-stress-induced ischemic neuronal cell damage. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 69, p. 181 – 196, 2014.

LI, X.; MAI, W.; WANG, L.; HAN, W. A hydroxyl-scavenging assay based on DNA damage in vitro. **Analytical Biochemistry**, v. 438, n. 1, p. 29-31, 2013.

MISHRA, K.; OJHA, H.; CHAUDHURY, N. K. Estimation of antiradical properties of antioxidants using DPPH assay: A critical review and results. **Food Chemistry**, v. 130, n. 4, p. 1036-1043, 2012.

MORENO, L. C. G. A. I.; OLIVEIRA, G. Z. S.; CAVALCANTI, I. M. F.; SANTOS-MAGALHÃES, N. S.; ROLIM, H. M. L.; FREITAS, R. M. Development and evaluation of liposomal formulation containing nimodipine on anxiolytic activity in mice. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 116, p.64–68, 2014.

NIKI, E. Assessment of Antioxidant Capacity in vitro and in vivo. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 49, n. 4, p. 503-515, 2010.

OLIVEIRA, G.Z.da S.de. Desenvolvimento e caracterização de uma formulação farmacêutica lipossomal contendo nimodipina: ensaios pré-clínicos com ênfase em transtornos psicossociais. 2013. 123f. **Dissertação (Mestrado em Ciências farmacêuticas), Universidade Federal do Piauí – UFPI, Piauí.**

OLIVEIRA, G.L.S.; OLIVEIRA, F.R.A.M.; ALENCAR, M.V.O.B.; JUNIOR, A.L.G.; ARAUJO, A. S.; CAVALCANTE, A.A.C.; FREITAS, R.M. Evaluation of antioxidant capacity of the aqueous extract of *Cynara scolymus* L. (Asteraceae) *in vitro* and in *Saccharomyces cerevisiae*. **African Journal of Pharmacy and**, v. 8, n. 5, p. 136-147, 2014.

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

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

ROCHA, N. F. M.; OLIVEIRA,G.V.; ARAJO, F. Y. R.; RIOS, E. R. V.; CARVALHO, A. M. R. ; VASCONCELOS, L. F.; MACEDO, D. S.; SOARES, P. M. G.; SOUSA, D. P.; SOUSA, F. C. F. Toxicological and pharmacological concerns on oxidative stress and related diseases. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 44, p. 455 – 461, 2011.

SAEIDNIA, S.; ABDOLLAHI, M. Toxicological and pharmacological concerns on oxidative stress and related diseases. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 273, p. 442 – 455, 2013.

SINGHAL, M.; PAUL, A.; SINGH, H. P. Synthesis and reducing power assay of methyl semicarbazone derivatives. **Journal of Saudi Chemical Society**, v. 1, p. 644-650, 2011.

TIAN, Y.Y.; GE, L.; DUAN, X.L.; GAO, Z. Q.; CHANG, Y. Z. Lycopene liposomes: lycopene release in vitro and pharmaceutical behaviors and antioxidation in vivo. **Acta Pharmaceutica Sinica**, v. 42, n. 10, p. 1107-1111, 2007.

VANCINI, R. L.; LIRA, C. A. B.; GUEDES JÚNIOR, D. P.; SILVA, A. C.; NOUAILHETAS, V. L. A. Influência do exercício sobre a produção de radicais livres. **Revista Brasileira de Atividade Física & Saúde**, v.10, p.47-58, 2005.

YAN, M; H.; WANG, X.; ZHU, X. Mitochondrial defects and oxidative stress in Alzheimer disease and Parkinson disease. **Free Radical Biology and Medicine**, v.62, p. 90 - 101, 2013

XU, C.; LIU, S.; LIU, Z.; SONG, F.; LIU, S. Superoxide generated by pyrogallol reduces highly water-soluble tetrazolium salt to produce a soluble formazan: A simple assay for measuring superoxide anion radical scavenging activities of biological and abiological samples. **Analytica Chimica Acta**, v. 793, p. 53-60, 2013.

CAPÍTULO III: Investigação do envolvimento do sistema serotoninérgico e dopinérgico no mecanismo de ação ansiolítico de uma formulação farmacêutica lipossomal contendo nimodipina

Investigação do envolvimento do sistema serotoninérgico e dopaminérgico no mecanismo de ação ansiolítico de uma formulação farmacêutica lipossomal contendo nimodipina

RESUMO

A ansiedade é um estado emocional com componentes fisiológicos e patológicos. A ansiedade patológica tem elevada prevalência mundial e pode ser definida como um estado emocional negativo com apresentação de sintomas de incerteza, tensão e inquietação podendo estar associados a prejuízos na vida pessoal e profissional do indivíduo. Trabalhos anteriores demonstraram que o uso de lipossomas contendo nimodipina (LCNa) apresenta atividade ansiolítica, sem causar sedação e relaxamento muscular. Nesse sentido, o objetivo deste trabalho foi avaliar o envolvimento dos receptores serotoninérgicos e dopaminérgicos no mecanismo de ação ansiolítico de uma formulação farmacêutica lipossomal contendo nimodipina, utilizando modelos animais com camundongos. Foram utilizados 7 animais por grupo, realizada a administração de LCNa (10 mg/kg, i.p) e nimodipina livre (10 mg/kg, v.o). Trinta minutos após os tratamentos, foi detectado um aumento do tempo de permanência no campo claro do teste claro/escuro, bem como aumento no número de entradas e no tempo de permanência nos braços abertos do teste labirinto em cruz elevada, entre animais tratados com LCNa em relação aos animais tratados com nimodipina (NMD) e com o veículo. A buspirona (5 mg/kg, i.p) e dopamina (0,5 mg/kg) promoveram aumento no tempo de permanência no campo claro, bem como no tempo de permanência nos braços abertos. No teste do campo aberto foi demonstrado que a buspirona reduziu o número de cruzamentos, *groomings* e *rearings* comparado ao veículo, já o LCNa aumentou o número de cruzamentos, de *groomings* e de *rearings* quando comparado a buspirona e não demonstraram alterações significativas com relação ao veículo. No teste *rota rod*, a buspirona promoveu aumento no número de quedas e diminuiu o tempo de permanência na barra giratória, em relação aos animais que receberam solução salina, a nimodipina e os lipossomas contendo nimodipina não provocaram alterações significativas comparadas ao veículo. Já a dopamina não apresentou resultados significativos comparados aos valores obtidos entre os animais tratados com veículo, NMD e LCNa em todos os parâmetros observados nos testes campo aberto e *rota rod*. O uso do WAY100635 (5 mg/kg, i.p) antagonizou os efeitos sobre a atividade ansiolítica do LCNa, da mesma forma, a sulpirida (50mg/kg) também reverteu estes efeitos. Não foram observadas alterações sobre a coordenação motora dos animais testados. Em suma, os resultados obtidos sugerem que há participação dos sistemas serotoninérgicos e dopaminérgicos no mecanismo de ação ansiolítico dos lipossomas contendo nimodipina.

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

INTRODUÇÃO

A ansiedade é um estado emocional que muitas vezes está associada com uma resposta a situações de perigo, ou ameaças reais, estresses e desafios do cotidiano, podendo apresentar sintomas somáticos, cognitivos, comportamentais, emocionais e perceptivos. A ansiedade passa a ser patológica quando apresenta um quadro emocional desagradável e incômodo que surge sem estímulo externo apropriado, sendo caracterizado quando a frequência, intensidade e duração destes eventos estão aumentadas e associadas ao prejuízo no desempenho pessoal, social ou profissional do indivíduo (BRAGA et al., 2010; CAÍRES; SHINOHARA, 2010; RODRIGUES, 2011). Sua origem está na base de diversos mecanismos neurobiológicos, ao nível do sistema nervoso central, como: o sistema serotoninérgico, o glutamato, o sistema ácido aminobutírico e o eixo hipotálamo-hipófise-suprarrenal (PRATA, 2012).

Os tratamentos atualmente aplicados para transtornos de ansiedade incluem a farmacoterapia e terapia cognitivo-comportamental. O tratamento farmacológico da ansiedade patológica consiste no uso de benzodiazepínicos, buspirona e antidepressivos. Embora estes fármacos mostrem grande eficácia na terapia da patologia, a sua administração pode provocar vários efeitos colaterais. Por exemplo, os benzodiazepínicos podem causar alguns efeitos secundários tais como amnésia, sedação e dependência. Já a utilização da buspirona pode desencadear quadros de tontura, cefaléia, sonolência, distúrbios gastrointestinais, amnésia e insônia. Portanto, a busca por novos agentes terapêuticos com propriedades ansiolíticas é de suma importância (FERREIRA; ALMEIDA; FREITAS, 2012; MORENO et al., 2014;).

A nimodipina, [isopropil(2-metoxietil), 1,4-diidro-2,6-dimetil-4-(3-nitrofenil)-3,5-piridina-dicarboxilada], pertencente à classe das diidropiridinas, antagonistas canais de cálcio, apresenta pouca solubilidade em água. A sua estrutura química apresenta duas longas cadeias laterais ligadas ao anel diidropiridínico e um grupo nitro ligado ao anel fenila, que confere ao fármaco a característica de base fraca. A baixa taxa de solubilidade e dissolução de fármacos pouco solúveis em água e nos fluidos gastrintestinais causa, frequentemente, uma insuficiente biodisponibilidade, uma vez que somente os fármacos dissolvidos nos líquidos gastrintestinais podem ser absorvidos, o que requer determinada hidrossolubilidade do fármaco (STEINGRABER et al., 2008).

A nimodipina possui alta lipossolubilidade e foi desenvolvida como agente para relaxar a vasculatura cerebral. É efetivo na inibição do vasoespasm cerebral e tem sido utilizado principalmente no tratamento de pacientes que apresentam defeitos neurológicos

associados ao vasoespasmos cerebral como hemorragia subaracnóidea (MICHEL et al., 2012).

A nimodipina pode atravessar facilmente a barreira hematoencefálica. Sua ação primária é bloquear os canais de cálcio tipo L e reduzir o número de canais abertos que conduzem íons cálcio através da membrana celular, restringindo portanto, o fluxo de cálcio dentro das células, além de produzir ação vasodilatadora sobre arteríolas (CÁRDENAS – MÉJILA et al., 2010).

É rapidamente absorvida após a administração oral, com pico de concentração plasmática, geralmente atingido em uma hora. Em estudos farmacocinéticos com pacientes saudáveis, mostrou biodisponibilidade de 4 a 13% e em pacientes que sofreram hemorragia subaracnóidea de 2 a 28%. A biodisponibilidade reduzida pode ser explicada pelo intenso metabolismo de primeira passagem (NASCIMENTO, 2005).

Assim, diante das limitações da administração oral da nimodipina, como baixa solubilidade em água e intenso metabolismo de primeira passagem com biodisponibilidade reduzida, são necessárias doses elevadas do fármaco com o objetivo de se obter os efeitos desejados. Uma alternativa a fim de se superar as limitações é o uso de lipossomas, vesículas de fosfolípidios com centro aquoso, possuem diferentes formas e tamanhos que variam de 30nm a vários micrômetros (GRUPTA et al., 2012). Foi demonstrado através de pesquisas realizadas pelo nosso grupo anteriormente, uma formulação lipossomal contendo nimodipina com alto teor do fármaco encapsulado, não demonstrou toxicidade em camundongos e apresentou efeito ansiolítico, antidepressivo e anticonvulsivante (MORENO, 2011).

Os lipossomas são sistemas altamente versáteis, capazes de reter princípios ativos encapsulados, apresentam propriedades de liberação lenta que levam à redução da concentração de princípio ativo na forma livre, e à prolongação de sua presença no organismo. O aumento na biodisponibilidade do princípio ativo pode potencializar sua atividade biológica, bem como reduzir seus efeitos colaterais (FRÉZARD et al, 2005). Podem aumentar a potência e/ou reduzir a toxicidade. Os lipossomas possuem inúmeras vantagens em relação a outras formas farmacêuticas, dentre as quais estão a alta especificidade, que permite o exercício de sua atividade farmacológica, com diminuição de efeitos secundários; são vetores medicamentosos, conseguem atingir um alvo bem determinado e até mesmo receptores celulares específicos, tornando-se menos tóxicos (CUNHA et al.,2007).

Diante destes benefícios e no sentido de dar continuidade aos estudos anteriores que geraram pedido de depósito de patente ao INPI com a formulação lipossomal contendo nimodipina (LCNa) foi realizada a investigação do envolvimento do sistema serotoninérgico e

dopaminérgico no mecanismo de ação ansiolítico de uma formulação farmacêutica lipossomal contendo nimodipina.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais

Foram utilizados camundongos *Swiss* machos com dois meses de idade e com peso de 25 a 30 g, provenientes do Biotério Central do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Piauí. Os animais destinados ao experimento permaneceram nas dependências do biotério do Laboratório de Pesquisa em Neuroquímica Experimental, por sete dias, para a adequada aclimatação. As unidades experimentais receberam água e dieta (Labina[®]) *ad libitum* e foram mantidos sob condições controladas de iluminação (ciclo 12h claro/escuro) e temperatura (25 ± 1 °C). Os protocolos experimentais e procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal do Piauí (CEEA/UFPI N° 014/11). Após o término de cada experimento os animais foram eutanasiados utilizando Pentobarbital Sódico i.p na dose 10-15 mg/100g de peso. Obedecendo Resolução n. 1000/2012 do Conselho Federal de Medicina Veterinária.

Produção da formulação lipossomal derivada de nimodipina (LCNa)

A formulação farmacêutica lipossomal contendo nimodipina (LCNa) foi preparada usando o método da hidratação do filme lipídico seguido de sonicação como descrito em Lira et al, 2009. Este processo foi adaptado para obtenção de uma formulação lipossomal com concentração lipídicas de 117,6 mM contendo 1,0 mg/mL de nimodipina (MORENO et al., 2014). Testes de caracterização dos nanossistemas foram realizados para acompanhamento dos parâmetros de pH, tamanho de partícula, índice de polidispersão, carga de superfície dos lipossomas, teor de metodologia empregada e percentual de encapsulação da nimodipina nas vesículas lipossomais. Testes de estabilidade acelerada e em longo prazo também foram realizados.

Protocolo experimental

Investigação do envolvimento serotoninérgico no mecanismo de ação ansiolítico de lipossomas contendo nimodipina

Os animais foram tratados de forma aguda, sendo cada grupo constituído por sete camundongos. Os protocolos de tratamento foram realizados da seguinte forma: solução salina 0,9% (i.p; controle negativo; veículo), buspirona 5 mg/kg (i.p; controle positivo), nimodipina livre 10 mg/kg (v.o) e LCNa (i.p) 10 mg/kg. Após 30 minutos das aplicações, os animais foram submetidos aos testes comportamentais para avaliação da atividade ansiolítica e dos parâmetros relacionados à atividade e coordenação motora.

Para investigar o possível envolvimento de LCNa com os sítios dos receptores 5-HT_{1A}, foi realizado pré-tratamento com WAY – 100635 (10 mg/kg i.p) 15 minutos antes das aplicações de LCNa (i.p) e buspirona (5 mg/kg i.p), bem como um outro grupo foi tratado apenas com WAY - 100635 na dose de 10 mg/kg (i.p). Dessa forma, as avaliações comportamentais nos testes de Campo Aberto, Claro/Escuro, Labirinto em Cruz Elevada e *Rota Rod* foram realizadas 30 minutos após a administração das últimas drogas.

Investigação do envolvimento dopaminérgico no mecanismo de ação ansiolítico de lipossomas contendo nimodipina

Os animais foram tratados de forma aguda, sendo cada grupo constituído por sete camundongos. Os protocolos de tratamento foram realizados da seguinte forma: solução salina 0,9% (i.p; controle negativo; veículo), dopamina 0,5 mg/kg (i.p; controle positivo), nimodipina livre 10 mg/kg (v.o) e LCNa (i.p) 10 mg/kg. Após 30 minutos das aplicações, os animais foram submetidos aos testes comportamentais para avaliação da atividade ansiolítica e dos parâmetros relacionados à atividade e coordenação motora.

Para investigar o possível envolvimento de LCNa com os sítios dos receptores dopaminérgicos – D₁ e D₂, foi realizado pré-tratamento com sulpirida (50 mg/kg i.p) 30 minutos antes das aplicações de LCNa (i.p) e dopamina (0,5 mg/kg i.p), bem como um outro grupo foi tratado apenas com sulpirida na dose de 50 mg/kg (i.p). Dessa forma, as avaliações comportamentais nos testes de Campo Aberto, Claro/Escuro, Labirinto em Cruz Elevada e *Rota Rod* foram realizadas 30 minutos após a administração das últimas drogas.

Avaliação do Efeito Ansiolítico

Teste do Claro/Escuro

O aparato usado nesse teste é feito de acrílico dividido em 2 compartimentos (campo claro e campo escuro) que se comunicam por meio de uma pequena porta (CRAWLEY, 1985; ALMEIDA et al., 2012), o compartimento escuro (acrílico preto, 27 x 18 x 29 cm) é pobremente iluminado, enquanto que o campo claro (acrílico transparente, 27 x 18 x 29 cm) é iluminado pela luz do ambiente (**Ilustração 1**). Os animais foram observados por 5 minutos, sendo utilizado como parâmetro seu tempo de permanência, em segundos, no campo claro. Depois de cada animal realizar seu teste individual, o equipamento foi limpo e desinfetado com álcool 70%.

Ilustração 1: Experimento Claro/Escuro



Fonte: Arquivo Pessoal

Teste do labirinto em cruz elevado

O objetivo deste teste é verificar o possível efeito ansiolítico ou ansiogênico de substâncias, uma vez que drogas ansiolíticas levam o animal ao aumento do número de entradas e o tempo de permanência nos braços abertos, enquanto que drogas ansiogênicas induzem ao aumento dos mesmos parâmetros nos braços fechados (LISTER, 1987).

O labirinto em cruz elevado (LCE) para camundongos consiste de dois braços abertos opostos (30 x 5 cm) e dois fechados (30 x 5 x 25 cm), também opostos, em forma de cruz (CAMPELO et al., 2011). Os braços abertos e fechados estão conectados entre si por uma plataforma central (5 x 5 cm), elevada a 45 cm do chão (**Ilustração 2**). Os animais foram colocados no centro do aparelho com a cabeça voltada para um dos braços fechados e o seu comportamento foi observado por 5 minutos. As medidas comportamentais registradas no

LCE foram o número de entradas nos braços abertos (NEBA) e o tempo de permanência do animal nesses braços (TPBA). Depois que cada animal realizou seu teste individual, o aparato foi limpo e desinfetado com álcool 70%.

Ilustração 2: Experimento Labirinto em Cruz Elevada



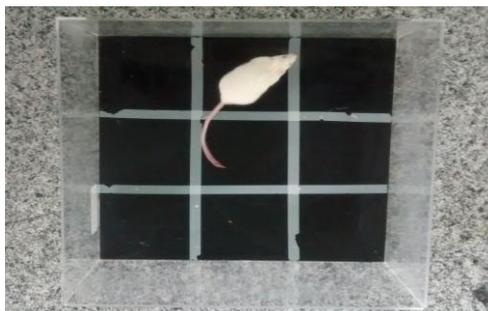
Fonte: Arquivo Pessoal

Avaliação da Atividade Locomotora e Coordenação Motora

Teste do campo aberto

A atividade motora dos animais será 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 (ARCHER, 1973) (**Ilustração 3**). Após 30 minutos dos tratamentos, os animais, um por vez, serão colocados no centro do campo aberto onde 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, serão observados durante o tempo de 5 minutos.

Após cada exposição de um animal, o aparelho deverá ser lavado com solução 5% álcool/ água (v/v) antes de introduzir novo sujeito experimental, a fim de evitar a possível influencia do odor deixado pelo anterior (FRUSSA – FILHO; PALERM- NETO, 1990).

Ilustração 3: Experimento Campo Aberto

Fonte: Arquivo Pessoal

Teste do *rota rod*

O teste do *Rota Rod* mede o efeito do relaxamento muscular ou incoordenação motora produzidos por drogas nos animais (CARLINI, BURGOS, 1979; MARQUES; MELO; FREITAS, 2012). Para este teste, os camundongos foram divididos em grupos e tratados conforme os protocolos experimentais. Em seguida, os animais foram colocados com as quatro patas sobre uma barra de 2,5 cm de diâmetro, elevada a 25 cm do piso, em uma rotação de 16 rpm (**Ilustração 4**), por um período de 3 minutos.

Foram registrados o tempo de permanência na barra giratória, em segundos(s), e o número de quedas, com três reconduções, no máximo. É verificada a capacidade do animal equilibrar-se sobre a barra. Quanto mais intenso for o efeito, menor será o tempo em que o animal consegue se equilibrar sobre a barra.

Ilustração 4: Experimento do Rota Rod

Fonte: Arquivo Pessoal

Análise Estatística

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

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Caracterização da formulação

Os lipossomas contendo nimodipina utilizados na realização dos testes comportamentais apresentam a seguinte caracterização físico-química: tamanho de partícula de $107,17 \pm 1,53$ nm, índice de polidispersão $0,303 \pm 0,002$ nm, potencial zeta $-5,32 \pm 1,29$ mV, pH 7,4, teor de fármaco de $99 \pm 0,21\%$ e taxa de encapsulação de $99 \pm 0,45\%$. Indicando que os LCNa se classificam como lipossomas unilamelares pequenos (SUV), com tamanho, homogeneidade e carga de superfície favoráveis para utilização em testes *in vivo*, além de apresentarem alto rendimento, elevada taxa de fármaco encapsulado e manutenção da estabilidade da formulação por um período de 15 dias sem alterar suas características micro e macroscópicas (MORENO, 2014). Os resultados obtidos dessa pesquisa resultaram em pedido de patente, com o seguinte número de processo: BR 10 2012 021840 2.

Teste do Claro/Escuro

O teste do claro/escuro avalia a ansiedade do roedor a nível comportamental. É fundamentado no comportamento exploratório espontâneo dos roedores frente a um ambiente novo e iluminado, podendo esses animais desenvolver aversão ou aceitação em face dessas novas condições. Entretanto, a tendência natural dos camundongos é ter uma predileção por áreas escuras. Quando se deparam ao aparato do Claro/Escuro os animais entram em conflito com propensão exploratória natural deles e a tendência de esquivar-se diante de ambientes desconhecidos (neofobia). Estudos anteriores atestam que drogas com propriedades ansiolíticas estimulam um maior número de transições entre esses dois ambientes, bem como aumentam o tempo exploratório do animal no campo claro (GOMES et al., 2011).

Os animais tratados com nimodipina livre não apresentaram aumento no tempo de permanência no campo claro em relação ao grupo tratado com o veículo (**Tabela 1**). Isso pode ser atribuído à reduzida biodisponibilidade por via oral da nimodipina. Por ser praticamente insolúvel em água, a sua veiculação em solução para outras vias de administração é dificultada, o que pode resultar em pouca distribuição cerebral, diminuindo sua eficácia sobre o sistema nervoso central, dificultando o uso deste fármaco para doenças neurodegenerativas (SUN et al., 2013).

Os grupos tratados com buspirona e com lipossomas contendo nimodipina (LCNa - 10mg/kg) apresentaram resultados semelhantes, produziram aumento de 80,65% e 83,04% respectivamente, no tempo de permanência no campo claro ($p < 0,05$) comparado ao grupo tratado com veículo, sugerindo que houve melhora na biodisponibilidade da nimodipina veiculada no sistema lipossomal. Os animais apresentaram um menor nível de ansiedade e um aumento da sua capacidade exploratória devido a ação da nimodipina, uma vez que após encapsulada em lipossomas, possui uma maior distribuição cerebral (**Tabela 1**).

Lipossomas contendo nimodipina possuem alta eficiência de encapsulação e demonstram capacidade de melhorar a solubilidade do fármaco (WANG et al., 2006). No estudo realizado por Moreno e colaboradores (2014) foi demonstrado que o encapsulamento da nimodipina em lipossomas proporciona uma liberação controlada da nimodipina, aumentando sua biodisponibilidade e assim, o seu efeito.

Dentre os receptores do sistema serotoninérgico, o receptor 5-HT_{1A} tem sido o mais relacionado com a modulação de comportamentos relacionados à ansiedade o que tem sido demonstrado pela buspirona, um agonista parcial 5-HT_{1A}, que é clinicamente efetivo no tratamento do transtorno de ansiedade generalizada. Estudos pré-clínicos demonstraram que agonistas 5-HT_{1A} exibem efeito tipo ansiolítico em modelos animais, enquanto que antagonistas 5-HT_{1A} bloqueiam o efeito tipo ansiolítico de algumas drogas. (AKIMOVA et al., 2010; KOEN; STEIN, 2011).

Na maior parte das áreas do SNC, a 5-HT possui forte ação inibitória. Essa ação é mediada pelos receptores 5-HT_{1A} e está associada à hiperpolarização da membrana causada pelo aumento da condutância de potássio. Alguns tipos de células são excitados lentamente pela 5-HT, devido bloqueio dos canais de potássio por meio de receptores 5-HT₂ ou 5-HT₄. Podem ocorrer ações tanto excitatórias quanto inibitórias no mesmo neurônio (KATZUNG et al., 2014). Os receptores de serotonina, 5-HT_{1A} são alvos-chave no controle dos distúrbios neuropsiquiátricos, incluindo depressão e os sintomas negativos da esquizofrenia (BLIER, 2003; BANTICK, 2004; CARLI et al, 2006).

Para investigar o envolvimento do sistema serotoninérgico no mecanismo de ação do LCNa, foi utilizado o WAY 100635 (N-[2-[4-(2-metoxifenil)-1-piperazinil]etil-N-(2-piridinil) ciclo hexanocarboxamida tricloridrato) que é um antagonista do receptor de serotonina, 5-HT_{1A}, que tem sido amplamente caracterizado quanto as suas propriedades farmacológicas. Estudos comprovaram que o WAY-100635 apresenta alta seletividade para os receptores de serotonina, 5-HT_{1A} com 100 vezes menor afinidades para outros receptores, como dopaminérgicos e adrenérgicos (FORSTER et. al., 1995; FLETCHER et. al, 1996)

O antagonismo do receptor de serotonina, pelo WAY 100635 foi demonstrado por meio dos resultados deste trabalho, em que o WAY 100635 (5mg/kg) administrado antes da buspirona (5mg/kg) reduziu 32,08% o tempo de permanência dos animais no campo claro durante o teste do claro/escuro (**Tabela 1**). O grupo tratado com WAY 100635 previamente a administração de LCNa (10 mg/kg) apresentou uma diminuição de 52,27% do tempo de permanência dos animais no campo claro em relação ao animais que não receberam o antagonista, o que aponta que o WAY 100635 antagonizou o efeito ansiolítico do LCNa (**Tabela 1**), sugerindo que o LCNa também atua na via serotoninérgica, e provavelmente nos receptores 5HT_{1A}, o mesmo sítio de ação do WAY 100635.

Tabela 1: Efeitos da nimodipina, formulação lipossomal contendo nimodipina (LCNa), buspirona, WAY100635 e suas associações em camundongos no teste do claro/escuro.

Grupos (n=7)	Tempo de permanência no compartimento claro (s)
Veículo (0,25 mL)	92,33 ± 2,33
Buspirona 5 mg/kg	166,80 ± 11,82 ^a
Nimodipina 10 mg/kg	109,2 ± 5,60
LCNa 10 mg/kg	169,0 ± 7,20 ^{a,c}
WAY 100635 5 mg/kg	104,20 ± 9,07
WAY 100635 5 mg/kg + Buspirona 5 mg/kg	74,17 ± 1,78 ^b
WAY 100635 5 mg/kg + LCNa 10 mg/kg	80,67 ± 7,23 ^d

Os resultados foram expressos como a média ± E.P.M. (Erro Padrão da Média) do número de animais usados em cada grupo nos experimentos. ^ap<0,05 quando comparado ao grupo veículo; ^bp<0,05 quando comparado ao grupo buspirona 5mg/kg; ^cp<0,05 quando comparado ao grupo nimodipina 10 mg/kg; ^dp<0,05 quando comparado ao grupo LCNa 10 mg/kg (ANOVA seguido do teste *Newman-Keuls* como *post hoc* teste).

O segundo protocolo investigou o envolvimento do sistema dopaminérgico no mecanismo de ação ansiolítico de uma formulação farmacêutica lipossomal contendo nimodipina.

A dopamina é um importante neurotransmissor cerebral, cujos efeitos são exercidos por meio de ligação aos receptores específicos de membrana D₁ e D₂. Os receptores dopaminérgicos desempenham importantes papéis na modulação neuronal, além das funções cerebrais como, memória, aprendizagem, ansiedade e medo condicionado (ZARRINDAST et al., 2012).

No teste claro-escuro foi observado que a dopamina promoveu um aumento de 19,44% no tempo de permanência dos animais no campo claro em relação ao veículo, e a nimodipina não encapsulada em lipossomas produziu aumento de 29,07% (**Tabela 2**). Já na forma encapsulada em lipossomas, a nimodipina apresentou maior resultado, aumentou 63,31% e 35,05%, ou seja, diminuiu o nível de ansiedade dos animais em relação aos grupos veículo e controle positivo, respectivamente ($p < 0,05$).

A sulpirida (SULP) pertence a uma classe especial de drogas antipsicóticas, as benzamidas, antagoniza os receptores dopaminérgicos pós-sinápticos, porém bloqueia seletivamente os receptores dopaminérgicos D₂, além de bloquear os receptores dopaminérgicos auto-inibitórios pré-sinápticos, aumentando a quantidade de neurotransmissor na fenda sináptica. A sulpirida provavelmente, não interage com receptores noradrenérgicos ou serotoninérgicos (VASCONCELOS, 2007; GIORGI et al., 2013; ANVISA, 2014).

Os animais tratados com sulpirida 30 (trinta) minutos antes da administração de dopamina reduziram 18,39% o tempo de permanência no campo claro em reação ao controle positivo (dopamina), produzindo resultados semelhantes aos encontrados no grupo veículo. Já o pré-tratamento da sulpirida ao LCNa reduziu 51,80% e o tempo de permanência no campo claro em relação ao resultado encontrado no grupo de animais tratados com LCNa isoladamente, os quais atingiram tempo inferior ao apresentado pelo grupo tratado com veículo. Sugerindo que LCNa pode atuar por meio dos receptores dopaminérgicos D₂.

Tabela 2: Efeitos da nimodipina, formulação lipossomal contendo nimodipina (LCNa), dopamina, sulpirida suas associações em camundongos no teste do claro/escuro.

Grupos (n=7)	Tempo de permanência no claro (s)
Veículo (0,25 mL)	92,43 ± 2,19
Dopamina 0,5 mg/kg	110,4 ± 6,00 ^a
Nimodipina 10 mg/kg	119,3 ± 4,74 ^a
LCNa 10 mg/kg	149,1 ± 6,09 ^{a,b,c}
Sulpirida 50 mg/kg	93,57 ± 6,26
Sulpirida 50 mg/kg + Dopamina 0,5 mg/kg	90,14 ± 10,06 ^b
Sulpirida 50 mg/kg + LCNa 10 mg/kg	71,86 ± 1,61 ^d

Os resultados foram expressos como a média ± E.P.M. (Erro Padrão da Média) do número de animais usados em cada grupo nos experimentos. ^ap<0,05 quando comparado ao grupo controle; ^bp<0,05 quando comparado ao grupo dopamina; ^cp<0,05 quando comparado ao grupo nimodipina 10 mg/kg; ^dp<0,05 quando comparado ao grupo LCNa 10 mg/kg (ANOVA seguido do teste *Newman-Keuls* como *post hoc* teste).

Teste do Labirinto em Cruz Elevada

O Teste do labirinto em cruz elevada (LCE) ou *plus-maze* é útil para investigar tanto agentes ansiolíticos quanto ansiogênicos. Drogas ansiolíticas aumentam o tempo gasto nos braços abertos e drogas ansiogênicas reduzem esses parâmetros (LISTER, 1987). O teste se baseia na aversão natural dos animais por lugares abertos (PELLOW et al., 1985).

De acordo com os dados obtidos é possível inferir que a bupiriona produziu aumento de 323,39% do tempo de permanência nos braços abertos em relação ao veículo (p<0,05), sem promover aumento do número de entradas nos braços abertos.

A nimodipina aumentou 101,03% o tempo de permanência nos braços abertos em relação ao veículo e na forma encapsulada em lipossomas aumentou 384,58%. Quanto ao número de entradas nos braços abertos, o LCNa aumentou 61,38% em relação ao veículo, 99,79% em relação à bupiriona (99,79%) e 112,47% em relação à nimodipina não encapsulada (**Tabela 3**).

Dessa forma, os resultados obtidos com o teste labirinto em cruz elevado, reforçam o que se observou no teste claro-escuro, o encapsulamento da nimodipina em lipossomas

produziu efeito ansiolítico em camundongos. Um dos objetivos básicos do encapsulamento de fármacos em lipossomas é a entrega específica no sítio alvo. Serem capazes de alterar a biodistribuição da substância encapsulada e protegê-la da inativação pelas defesas naturais do organismo. Além disto, fármacos encapsulados em lipossomas exibem melhor estabilidade, penetração e eficácia utilizando menores doses (PIERRE; COSTA, 2011).

Os animais pré-tratados com WAY100635 e posterior administração de buspirona e LCNa apresentaram redução de 70,16% e 76,96, respectivamente, no número de entradas e, 78,16% e 77,63%, respectivamente, no tempo de permanência nos braços abertos em comparação aos animais que não receberam o antagonista ($p < 0,05$). Sugerindo que o efeito ansiolítico do LCNa foi revertido pelo WAY100635, por meio dos receptores 5-HT_{1A}, o que reforça a hipótese de que o LCNa atua sobre o sistema serotoninérgico.

Tabela 3: Efeitos da nimodipina, formulação lipossomal contendo nimodipina (LCNa), buspirona, WAY100635 e suas associações em camundongos no teste do labirinto em cruz elevada.

Grupos (n=7)	Número de entradas nos braços abertos	Tempo de permanência nos braços abertos (s)
Veículo (0,25 mL)	6,00 ± 0,31	40,86 ± 2,77
Buspirona 5 mg/kg	4,86 ± 0,80	173,0 ± 31,30 ^a
Nimodipina 10 mg/kg	4,57 ± 0,30	82,14 ± 9,31 ^a
LCNa 10 mg/kg	9,71 ± 1,02 ^{a,b,c}	198,0 ± 8,99 ^{a,b,c}
WAY 100635 5 mg/kg	5,43 ± 0,68	48,29 ± 3,07
WAY 100635 5 mg/kg + Buspirona 5 mg/kg	1,43 ± 0,20 ^b	39,86 ± 13,19 ^b
WAY 100635 5 mg/kg + LCNa 10 mg/kg	2,14 ± 0,34 ^d	44,29 ± 6,00 ^d

Os resultados foram expressos como a média ± E.P.M. (Erro Padrão da Média) do número de animais usados em cada grupo nos experimentos. ^a $p < 0,05$ quando comparado ao grupo veículo; ^b $p < 0,05$ quando comparado ao grupo buspirona 5mg/kg; ^c $p < 0,05$ quando comparado ao grupo nimodipina 10 mg/kg; ^d $p < 0,05$ quando comparado ao grupo LCNa 10 mg/kg; ^e $p < 0,05$ quando comparado ao grupo WAY100635 5 mg/kg (ANOVA seguido do teste Newman-Keuls como *post hoc* teste).

No segundo protocolo, os animais tratados com dopamina, controle positivo, apresentaram um aumento de 126,21% no tempo de permanência nos braços abertos em relação ao veículo ($p < 0,05\%$).

Comparando com o grupo tratado com veículo, a nimodipina aumentou 106,01% o tempo de permanência nos braços abertos. No entanto, o resultado obtido foi menor que o encontrado com o uso da dopamina (126,21%). Entretanto, a nimodipina encapsulada em lipossoma promoveu aumento de 214,12%, 37,40 e 54,61% no tempo de permanência nos braços abertos em relação aos grupos veículo, controle positivo e nimodipina livre ($p < 0,05$) (**Tabela 4**).

A administração do antagonista D_2 trinta minutos antes do LCNa causou redução de 39,62% no número de entradas e 48,99% no tempo de permanência nos braços abertos nos animais tratados. Sugerindo o mecanismo de ação ansiolítico dos lipossomas contendo nimodipina tenha participação dos receptores D_2 .

Tabela 4: Efeitos da nimodipina, formulação lipossomal contendo nimodipina (LCNa), dopamina, sulpirida e suas associações em camundongos no teste do labirinto em cruz elevada.

Grupos (n=7)	Número de entradas nos braços abertos	Tempo de permanência nos braços abertos (s)
Veículo (0,25 mL)	6,00 ± 0,31	40,86 ± 2,77
Dopamina 0,5 mg/kg	4,71 ± 0,56	92,43 ± 21,29 ^a
Nimodipina 10 mg/kg	4,57 ± 0,30	82,14 ± 9,45 ^a
LCNa 10 mg/kg	8,43 ± 0,68 ^{a,b,c}	127,0 ± 8,55 ^{a,b,c}
Sulpirida 50 mg/kg	5,00 ± 0,44	49,43 ± 3,22
Sulpirida 50 mg/kg + Dopamina 0,5 mg/kg	4,43 ± 0,78	93,57 ± 6,26
Sulpirida 50 mg/kg + LCNa 10 mg/kg	5,09 ± 0,31 ^d	65,29 ± 13,5 ^d

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

Campo Aberto

O teste do campo aberto é usado para avaliar a atividade locomotora espontânea do animal (ALMEIDA, 2012; ARCHER, 1973). O teste avalia compostos ansiolíticos quanto à atividade motora e capacidade de deambulação, analisando se o composto em estudo causa alterações na consciência e tônus muscular. No teste, é observado 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 (ANDRADE et al., 2012; MORENO et al., 2014).

Em roedores, o *grooming* é um dos comportamentos mais frequentes, muitas vezes, está correlacionado com níveis de ansiedade e excitação. Considerando que é uma preocupação com o próprio corpo, quando confrontado por estímulo ansiogênico, há uma tendência de que o *grooming* seja reduzido. O *grooming* parece estar reduzido tanto com fármacos benzodiazepínicos quanto com serotoninérgicos (ROTH et al., 2013; ENNACEUR, 2014).

O *rearing* é ocorre quando o animal consegue levantar as patas dianteiras a um ângulo superior a 45° com a superfície, permanecendo apoiado apenas nas patas traseiras, adotando postura ereta. Tal comportamento é considerado um movimento de exploração vertical, um indicador do nível de ansiedade. Redução no número de *rearing* foi interpretada como resposta em níveis elevados de ansiedade. Frequentemente, os animais permanecem mais tempo na periferia do aparelho, do que nas áreas mais centrais, essa preferência tem sido interpretada por tigmotaxia. Existem relatos de que o *rearing* ocorre principalmente nos cantos das paredes do campo aberto (LAMPREA et al., 2008; ENNAUCER, 2014).

O *rearing* é considerado uma função do nível de excitabilidade do sistema nervoso central. Diminuição do número de *reearings* e do número de cruzamentos sugere ação dopaminérgica (ALMEIDA et al., 2012). Os resultados de Starr e Starr (1986) sugerem que os receptores da dopamina D₂ estão associados aos mecanismos de locomoção e *rearing*, já os receptores D₁ podem estar associados com a expressão de *grooming*.

Truit e Fundytus (1988) relataram que a propensão natural dos roedores de ficar perto dos limites de um ambiente novo, tigmotaxia pode ser suprimida por agentes ansiolíticos. Drogas ansiolíticas como a buspirona, por exemplo, reduzem a tigmotaxia, por diminuir os níveis de ansiedade. O envolvimento simultâneo dos receptores dopaminérgicos D₁ e D₂ tem evidenciado efeito ansiogênico associado ao aumento da transmissão dopaminérgica (SIMON et al., 1994).

A redução no número de *groomings* e *rearings* dos animais tratados com buspirona comparados com o grupo controle sugere que a buspirona reduziu a mobilidade dos animais, uma vez que a buspirona é agonista parcial dos receptores da serotonina 5-HT_{1A} e antagonista dos autorreceptores da dopamina D₂. A buspirona parece suscetível de afetar a resposta fornecendo, resultados promissores quanto à sua utilização na atenuação da discinesia na doença de Parkinson e ataxia (LOANE et al., 2012).

Os animais tratados com nimodipina e LCNa apresentam comportamentos semelhantes aos animais tratados com o veículo não havendo alteração na mobilidade dos animais, apresentaram menores efeitos adversos comparados à buspirona. Moreno e colaboradores (2014) demonstraram que NMD e LCNa não alteram a mobilidade dos animais testados no teste campo aberto, bem como ocorreu com os animais tratados com diazepam.

Efeitos psicomotores, sedação, incoordenação motora, efeitos de tolerância e rebote são relatos como efeitos adversos causados pelo uso de benzodiazepínicos (DELL'OSSO et al., 2013; MORENO et al., 2014). Mansoure e colaboradores (2014) em seu trabalho relata a necessidade de busca por compostos ansiolíticos eficazes e com menores efeitos colaterais dos benzodiazepínicos e início de ação mais rápido que agonistas serotoninérgicos 5-HT_{1A}, como a buspirona, por exemplo.

A análise dos resultados obtidos no presente estudo sugere que NMD livre e LCNa são capazes de exercer efeito ansiolítico, causando menos efeitos secundários que a buspirona, representados pela melhoria na capacidade exploratória locomotora dos animais estudados.

A administração do antagonista seletivo 5-HT_{1A}, WAY 100635, não demonstrou efeito ansiogênico e nem exerceu efeito sobre a atividade locomotora dos roedores, quando administrado isoladamente, uma vez que WAY 100635 é antagonista seletivo dos receptores 5HT_{1A}. Neste protocolo experimental foi utilizado com o intuito de investigar o possível envolvimento dos lipossomas contendo nimodipina com os receptores serotoninérgicos quanto a capacidade exploratória locomotora.

Os grupos de camundongos tratados com BUSP e LCNa foram pré-tratados com WAY 100635, no sentido de verificar o envolvimento do sistema de neurotransmissão serotoninérgica, em especial, dos receptores 5-HT_{1A} sobre a atividade locomotora dos animais tratados. Após o tratamento com WAY 100635 foi verificada uma redução dos parâmetros observados comparado com os resultados obtidos com os grupos que não receberam tratamento com este antagonista (**Tabela 5**). Os animais que receberam o antagonista antes da buspirona apresentaram resultados semelhantes aos obtidos com o grupo controle. No entanto, os animais tratados com WAY 100635 antes do LCNa demonstraram redução na capacidade

exploratória locomotora dos animais, o que foi demonstrado pela redução de todos os parâmetros observados neste teste (60,51%; 58,25% e 89,83%, para o número de cruzamentos, *groomings* e *rearings*, respectivamente), sugerindo que LCNa pode exercer o seu mecanismo de ação por meio dos receptores 5-HT_{1A}.

Tabela 5: Efeitos da nimodipina, formulação lipossomal contendo nimodipina (LCNa), buspirona, WAY100635 e suas associações em camundongos no teste do campo aberto.

Grupos (n=7)	Número de Cruzamentos	Número de <i>Groomings</i>	Número de <i>Rearings</i>
Veículo (0,25 mL)	63,29 ± 2,48	3,71 ± 0,29	17,14 ± 1,24
Buspirona 5 mg/kg	40,14 ± 7,43 ^a	2,14 ± 0,83 ^a	7,00 ± 1,88 ^a
Nimodipina 10 mg/kg	63,86 ± 3,32	4,00 ± 0,58	17,57 ± 1,31
LCNa 10 mg/kg	66,57 ± 3,96 ^b	3,14 ± 0,40 ^b	18,29 ± 2,21 ^b
WAY100635 5 mg/kg	62,29 ± 6,14	4,71 ± 0,64	15,57 ± 1,78
WAY 100635 5 mg/kg + BUSP 5 mg/kg	65,86 ± 4,90 ^b	3,71 ± 0,42 ^b	17,57 ± 3,03 ^b
WAY100635 5 mg/kg + LCNa 10 mg/kg	26,29 ± 4,48 ^c	1,29 ± 0,36 ^c	1,86 ± 0,34 ^c

Os resultados foram expressos como a média ± E.P.M. (Erro Padrão da Média) do número de animais usados em cada grupo nos experimentos. ^ap<0,05 quando comparado ao grupo veículo; ^bp<0,05 quando comparado ao grupo buspirona 5mg/kg; ^cp<0,05 quando comparado ao grupo LCNa 10 mg/kg (ANOVA seguido do teste *Newman-Keuls* como *post hoc* teste).

No segundo protocolo, investigação do envolvimento dos receptores dopaminérgicos foi verificado que os grupos tratados com dopamina, nimodipina isolada e lipossomas contendo nimodipina, produziram resultados muito próximos aos resultados encontrados no grupo tratado apenas com o veículo. Sugerindo que LCNa e NMD não alteraram a atividade locomotora dos animais testados.

Tabela 6: Efeitos da nimodipina, formulação lipossomal contendo nimodipina (LCNa), dopamina, sulpirida, e suas associações em camundongos no teste do campo aberto.

Grupos (n=7)	Número de Cruzamentos	Número de <i>groomings</i>	Número de <i>Rearings</i>
Veículo (0,25 mL)	64,29 ± 1,74	3,71 ± 0,28	24,43 ± 0,78
Dopamina 0, 5 mg/kg	60,29 ± 2,94	3,86 ± 0,74	21,57 ± 1,08
Nimodipina 10 mg/kg	63,86 ± 3,37	4,00 ± 0,22	24,86 ± 0,96
LCNa 10 mg/kg	66,14 ± 3,37	3,86 ± 0,26	25,43 ± 1,19
Sulpirida 50 mg/kg	64,14 ± 2,31	3,71 ± 0,36	24,86 ± 3,11
Sulpirida 50 mg/kg + Dopamina 0,5 mg/kg	46,00 ± 3,05 ^a	2,00 ± 0,22 ^a	9,86 ± 0,67 ^a
Sulpirida 50 mg/kg + LCNa 10 mg/kg	23,71 ± 6,53 ^b	1,57 ± 0,37 ^b	3,57 ± 0,84 ^b

Os resultados foram expressos como a média ± E.P.M. (Erro Padrão da Média) do número de animais usados em cada grupo nos experimentos. ^ap<0,05 quando comparado ao grupo dopamina; ^bp<0,05 quando comparado ao grupo LCNa 10 mg/kg (ANOVA seguido do teste *Newman-Keuls* como *post hoc* teste).

O pré-tratamento com sulpirida à administração de dopamina promoveu redução de 23,70% do número de cruzamentos, 48,18% do número de *groomings* e 54,28% do número de *rearing*s e o uso do antagonista antes do LCNa promoveu redução de 64,15%; 59,32% e 85,96% todos os parâmetros analisados, números de cruzamentos, *groomings* e *rearing*s, respectivamente. (Tabela 6) (p<0,05). Sugerindo que a sulpirida reverteu o efeito sobre a atividade locomotora dos animais testados.

Rota Rod

Perda de equilíbrio e incoordenação motora são observados após o uso de substâncias ansiogênicas. O teste *rota rod* descrito por Dunham & Miya (1957), é um teste de escolha para avaliar o potencial do efeito de relaxamento muscular e incoordenação motora em estudos experimentais, cujo efeito é avaliado com base na capacidade dos animais permanecerem na barra giratória durante 3 (três) minutos. Quanto maior o relaxamento

muscular, o animal se equilibrará por menos tempo sobre a barra giratória (YADAV et al., 2009; ARAÚJO, 2011; TRAILOVIC et al., 2011).

Os resultados obtidos no teste *rota rod* são importantes pois sugerem que o LCNa não oferece efeitos prejudiciais ao desempenho motor, fato este bastante interessante quando se busca tratamentos farmacológicos para ansiedade que não causem comprometimento da coordenação motora.

A nimodipina livre e o lipossoma contendo nimodipina não causaram alterações no número de quedas e no tempo de permanência dos animais testados sobre a barra giratória comparado com o grupo tratado com veículo apenas, apontando que tanto a NMD quanto o LCNa não promovem sedação, não produzira efeitos sobre o relaxamento muscular e coordenação motora.

Já o grupo tratado com buspirona, quando comparado ao grupo controle, foi observado um aumento no número de quedas de 27,38% e uma diminuição do tempo de permanência na barra giratória de 14,32% ($p < 0,05$).

Administrada cronicamente em ratos, a buspirona não alterou a dinâmica da ligação do receptor de dopamina; entretanto, o grau de ligação à serotonina tipo 2 e aos sítios β - adrenérgicos é diminuído. Estudos sugerem que a buspirona pode ter efeitos indiretos sobre os outros sistemas de receptores de neurotransmissão, incluindo os receptores benzodiazepínicos, GABA e de dopamina. Com relação à dopamina, a buspirona parece atuar como um antagonista pré-sináptico da dopamina. Quando os pacientes que receberam buspirona foram comparados com pacientes que receberam placebo, tontura, cefaléia, nervosismo, vertigens, náuseas, excitação, sudorese, coordenação anormal e tremor foram algumas das reações adversas comuns apresentadas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014). Portanto, umas das vantagens do lipossoma desenvolvido é a redução destes efeitos adversos.

A administração do antagonista seletivo 5-HT_{1A}, WAY 100635, quinze minutos antes da administração de buspirona e LCNa não causou efeitos significativos com relação aos respectivos controles positivos, buspirona e LCNa, sugerindo que o receptor 5-HT_{1A} não é responsável pelo controle do tônus e relaxamento muscular.

Tabela 7: Efeitos da nimodipina, formulação lipossomal contendo nimodipina (LCNa), buspirona, WAY100635 e suas associações em camundongos no teste *rota rod*.

Grupos (n=7)	Número de quedas	Tempo de permanência (s)
Veículo (0,25 mL)	1,57 ± 0,20	171,1 ± 5,45
Buspirona 5 mg/kg	2,00 ± 0,38	146,6 ± 11,27 ^a
Nimodipina 10 mg/kg	1,71 ± 0,18	174,6 ± 2,11
LCNa 10 mg/kg	1,57 ± 0,20	174,1 ± 2,70
WAY100635 5 mg/kg	1,57 ± 0,29	177,1 ± 10,25
WAY100635 5 mg/kg + BUSP 5 mg/kg	1,86 ± 0,46	148,1 ± 12,35
WAY100635 5 mg/kg + LCNa 10 mg/kg	2,00 ± 0,31	177,7 ± 2,28

Os resultados foram expressos como a média ± E.P.M. (Erro Padrão da Média) do número de animais usados em cada grupo nos experimentos.

A respeito da investigação do possível envolvimento dos receptores dopaminérgicos no mecanismo de ação ansiolítico do LCNa, foi verificado que a dopamina não alterou o tempo de permanência e o número de quedas dos animais testados em relação ao grupo de animais tratados com o veículo.

A administração de nimodipina e LCNa também não produziram alterações no número de quedas e no tempo de permanência na barra giratória quando comparados ao grupo tratado com veículo (Tabela 8). Portanto, os tratamentos com nimodipina e LCNa não provocaram sedação, alteração na coordenação motora e não foi produzido efeito miorelaxante.

No teste *rota rod* foi observado que pode não haver envolvimento dos receptores D₂ sobre o desempenho psicomotor, equilíbrio, coordenação motora e efeito miorelaxante dos animais testados por meio da pré-administração de sulpirida à dopamina e LCNa, uma vez que não foram observadas alterações nos parâmetros estudados (Tabela 8).

Tabela 8: Efeitos da nimodipina, formulação lipossomal contendo nimodipina (LCNa), dopamina, sulpirida e suas associações em camundongos no teste *rota rod*.

Grupos (n=7)	Número de quedas	Tempo de permanência (s)
Veículo (0,25 mL)	1,57 ± 0,20	175,4 ± 2,44
Dopamina 0, 5 mg/kg	1,43 ± 0,43	178,4 ± 0,20
Nimodipina 10 mg/kg	1,57 ± 0,20	173,7 ± 2,64
LCNa 10 mg/kg	1,57 ± 0,30	172,7 ± 2,65
Sulpirida 50 mg/kg	1,71 ± 0,18	175,4 ± 0,95
Sulpirida 50 mg/kg + Dopamina 0,5 mg/kg	1,43 ± 0,20	177,7 ± 0,56
Sulpirida 50 mg/kg + LCNa 10 mg/kg	1,43 ± 0,78	171,1 ± 2,47

Os resultados foram expressos como a média ± E.P.M. (Erro Padrão da Média) do número de animais usados em cada grupo nos experimentos.

CONCLUSÃO

Em conclusão, os resultados do presente estudo demonstram que a administração de LCNa apresentou atividade ansiolítica por meio dos receptores 5-HT_{1A} e com envolvimento dos receptores dopaminérgicos D₂, sem causar sedação e sem comprometer a coordenação motora dos animais testados.

REFERÊNCIAS

- ACHER, J., 1973. Tests for emotionality in rats and mice. A review. **Animal Behavior**. v.21, p. 205–235, 1973.
- AKIMOVA, E.; LANZENBERGER, R.; KASPER, S. The serotonin-1A receptor in anxiety disorders. **Biology Psychiatry**, v. 66, p. 627-635, 2009.
- ALMEIDA, A.A.C.; COSTA, J.P.; CARVALHO, R.B.F.; SOUSA, D.P.; FREITAS, R.M. Evaluation of acute toxicity of a natural compound (p)-limonene epoxide and its anxiolytic-like action. **Brain Research**, v. 1448, p.56–62, 2012.

ANDRADE, T.M.; MELO, A.S.; DIAS, R.G.C.; VARELA, E.L.P.; OLIVEIRA, F.R.; VIERA, J.L.F.; ANDRADE, M.A.; BAETAS, A.C.; MONTEIRO, M.C.; MAIA, C.S.F. Potential behavioral and pro-oxidant effects of *Petiveria alliacea* L. extract in adults rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 143, n. 2, p. 604-610, 2012.

ANVISA. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. Disponível em: < http://www.anvisa.gov.br/datavisa/fila_bula/frmResultado.asp# >. Acesso em: 28 Jul. 2014.

ARAUJO, F.Y.R. **Avaliação dos possíveis efeitos antipissicóicoa da *Alpinia zerumbet* em camundongos**. Dissertação de mestrado (mestrado em farmacologia) – Universidade Federal do Ceará, 115f. Fortaleza, Ceará, 2011.

BANTICK, R. A., DEAKIN, J. F. W., GRASBY, P. The 5-HT_{1A} receptor in schizophrenia: a promising target for novel atypical neuroleptics? **Journal Psychopharmacology**, v. 15, p.37–46, 2001.

BLIER, P., WARD, N. M. Is there a role for 5-HT_{1A} agonists in the treatment of depression? **Biology Psychiatry Journal**, v. 53, p.193–203, 2003.

BRAGA, J.E.F.; PORDEUS, L.C.; SILVA, A.T.M.C.; PIMENTA, F.C.F.; DINIZ, M.F.F.M.; ALMEIDA, R.N. Ansiedade Patológica: Bases Neurais e Avanços na Abordagem Psicofarmacológica. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**, v. 14, n. 2, p.93-100, 2010.

CAÍRES, M.C.; SHINOHARA, H. Transtornos de ansiedade na criança: um olhar nas comunidades. **Revista Brasileira de Terapias Cognitivas**, v.6, n. 1, p. 62-84, 2010.

CAMPÊLO, L. M. L.; FEITOSA, C. M.; TOMÉ, A. R.; FREITAS, R. M. Avaliação do potencial neuroprotetor do óleo essencial de *Citrus limon* em hipocampo e corpo estriado de camundongos após convulsões induzidas por pilocarpina. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas medicinales y Aromaticas**, v. 10, p. 116 – 126, 2011.

CÁRDENAS – MÉJILA, A.; GOMEZ, C.G.; ESTRADA - TRISTÁN, C. A.; AGUIRRE - CRUZ, M.L. **Efecto del nimodipino sobre la integración de injertos nerviosos en ratas**. *Cirurgía Plástica*, v. 20, n.1, p. 6-16 -16, 2010.

CARLI, M., BAVIERA, M., INVERNIZZI, R.W., BALDUCCI, C. Dissociable contribution of 5-HT_{1A} and 5-HT_{2A} receptors in the medial prefrontal cortex to different aspects of executive control such as impulsivity and compulsive perseveration in rats. **Neuropsychopharmacology**, v. 31, p.757-767, 2006.

CARLINI, E. A., BURGOS, V. *Screening* farmacológico de ansiolíticos: metodologia laboratorial e comparação entre o diazepam e o clorobenzapam. **Revista da Associação Brasileira de Psiquiatria**, v. 1, p. 25-31, 1979.

CRAWLEY, J.N. Neuropharmacologic specificity of a simple model for the behavioural actions of benzodiazepines. **Pharmacology Biochemistry Behaviour**, v. 695-699, 1981.

CUNHA, T. N. da; SOARES, I. C.; GASPARI, E. “Em busca de lipossomas inteligentes para administração de drogas para tuberculose.” **BEPA – Boletim Epidemiológico Paulista**, v. 4, n.39, 2007.

DELL'OSSO, B. LADER, M. Do benzodiazepines still deserve a major role in the treatment of psychiatric disorders? A critical reappraisal. **European Psychiatry**, v. 28, n.1, p. 7-20, 2013.

DUNHAM, N.W., MIYA, T.S. A note on a simple apparatus for detection of neurological deficit in rats and mice. **Journal American Pharmacists Association**, v. 1957, n. 46, p.208-209.

ENNACEUR, A. Tests of unconditioned anxiety - Pitfalls and disappointments. **Physiology & Behavior**, v. 135, p. 55-71, 2014.

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

FLETCHER, A.; FORSTER A.; BILL, D. J. et al. Electrophysiological, biochemical, neurohormonal and behavioural studies with WAY-100635, a potent, selective and silent 5-HT_{1A} receptor antagonist. **Behavioural Brain Research**, v. 73, 337–353, 1996.

FORSTER, E.A. A pharmacological profile of the selective silent 5-HT_{1A} receptor antagonist, WAY-100635. **European Journal Pharmacology**, v. 281, 81–88, 1995.

FREZARD, F.; SCHETTINI, D. A.; ROCHA, O. G. F.; DEMICHELI, C. Lipossomas: propriedades físico-químicas e farmacológicas, aplicações na quimioterapia à base de antimônio. **Química Nova**, v. 28, n. 3, 2005.

FRUSSA-FILHO, R.; PALERMO – NETO, J. Effects of single and long term droperidol administration on open-field and stereotyped behavior of rats. **Brazilian Journal of medical and biological research**, v. 50, p. 825-830, 1991.

GIORGI, M.; OZDEMIR, M.; CAMILLO, F.; PANZANI, D. Pharmacokinetics of sulpiride after intravenous, intramuscular and oral single-dose administration in nurse mares. **Journal of equine veterinary sciences**, v. 33, p.533-538, 2013.

GOMES, P.B.; FEITOSA, M.I.; SILVA, E.C.; NORONHA, B.A.; MOURA, E.T.; VENÂNCIO *et al.* Amonoterpene -like effect of monoterpene 1,4-cineole in mice, **Pharmacology Biochemistry Behavior**, v. 96, p. 287-293, 2010.

GRUPTA, A.; ARORA, A.; MENASKHI, A.; SEGHAL, A.; SEGHAL, R. Nanotechnology and Its Applications in Drug Delivery: A Review. **International Journal of Medicine and Molecular Medicine**. v. 3, n. 1, p. 1-9, 2012.

KATZUNG, B.G.; MASTERS, S.B.; TREVOR, A.J. **Farmacologia Básica e Clínica**. 12 ed. McGrawHill, Porto Alegre, 2014. Cap. 22, p. 359-371.

KOEN, N.; STEIN, D.J. Pharmacotherapy of anxiety disorders: a critical review. **Dialogues in Clinical Neuroscie**, v. 13, n. 4, p. 423-437, 2011.

LAMPREA, M.R.; CARDENAS, F.P.; SETEM, J.; MORATO, S. Thigmotactic responses in an open-field. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 41, p. 135-140, 2008.

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 up take and antimycobacterial activity of liposomal usnic acid formulation. **Journal of Liposome Research**, v. 19, p. 49-58, 2009.

LISTER, R. G. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. **Psicopharmacology**. V. 92, n. 2, p. 180-185, 1987.

LOANE, C.; POLITIS, M. Buspirone: Whats is it all about? **Brain Research**. v. 1461, p. 111-118, 2012.

MANSOURI, M.T.; SOLTANI, M.; NAGHIZADEH, B.; FARBOOD, Y.; MASHAK, A.; SARKAKI, A. A possible mechanism for the anxiolytic-like effect of gallic acid in the rat elevated plus maze. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 117, p. 40-46, 2014.

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

MICHEL, T.; HOFFMAN, B. B. Tratamento da isquemia miocárdica e da hipertensão. In: BRUTON, L. L.; CHABENER, B. A.; KNOLLMANN, B. C. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica de Goodman & Gilman**. São Paulo: Mc Graw Hill, 2012, p. 745 – 788.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Bulário [citado 28 jul. 2014]. Brasília(DF), 2014. Disponível em: < http://www.anvisa.gov.br/datavisa/fila_bula/frmResultado.asp# >

MORENO, L. C. G. A. I.; OLIVEIRA, G. Z. S.; CAVALCANTI, I. M. F.; SANTOS-MAGALHÃES, N. S.; ROLIM, H. M. L.; FREITAS, R. M. Development and evaluation of liposomal formulation containing nimodipine on anxiolytic activity in mice. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 116, p.64–68, 2014.

MORENO, L.C.G.A.I. **Delineamento e caracterização de lipossomas contendo nimodipina para uso direcionado a doenças neurodegenerativas**. 2011. 105f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Universidade Federal do Piauí – UFPI, Piauí.

NASCIMENTO, V.S. “**Estudo do processo convulsivo e das ações da nimodipina no modelo de convulsão com pilocarpina em ratos jovens**”. 2005. 151f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) Universidade Federal do Ceará – UFC, Ceará.

PELLOW, S.; CHOPIN, P.; FILE, S. E.; BRILEY, M. Validation of open: closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. **Journal of neuroscience methods**, v. 14, n. 3, p. 149-167, 1985.

PIERRE, M.B.R.; COSTA, I.S.M. Liposomal drug systems for demal and transdermal applications. **Archives of Dermatological Research**. v. 303, n. 9, p. 607-621, 2011.

PRATA, F.P.M. **Tratamento da ansiedade**. 2012. 65f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade de Ciências da Saúde, Porto.

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

ROTH, A.; KYZAR, E.J.; CACHAT, J.; STEWART, A.M.; GREEN, J.; GAIKWAD, S.; O'LEARY, T.P.; TABAKOFF, B.; BROWN, R.E.; KALUEFF, A.V. **Potential translational targets revealed by linking mouse grooming behavioral phenotypes to gene expression using public databases**. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, v. 40, p. 312-325, 2013.

SIMON, P.; DUPUIS, R.; COSTENTIN, J. Thigmotaxis as an index of anxiety in mice. Influence of dopaminergic neurotransmissions. **Behavioral Brain Research**, v. 61, n.1, p. 59-64, 1994.

STARR, B.S.; STARR, M.S. Differential effects of dopamine D₁ e D₂ agonists on velocity of movement and grooming in the mouse: Implications for the roles of D₁ and D₂ receptors. **Neuropharmacology**, v. 25, n.5, p. 455-463, 1986.

STEINGRABER, T.; SHTOLTZ, T.; OENING RODRIGUES. STEINGRABER, T.; SHTOLTZ, T.; OENING RODRIGUES, P. Avaliação da Influência de adjuvantes não poliméricos solúveis na liberação de nimodipino a partir de formulações matriciais de liberação prolongada. **Revista Colombiana de Ciências Químico Farmacêuticas**, v.37, n. 2, 2008.

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

TRAILOVIC, S.M.; IVANOVIC, S.R.; VARAGIC, V.M. Ivermectin effects on motor coordination and contractions of isolated rat diaphragm. **Research in Veterinary Science**, v. 91, p. 426-433, 2011.

TREIT, D.; FUNDYTUS, M. Thigmotaxis as a test for anxiolytic activity in rats. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 31, n. 4, p. 959-962, 1988.

VASCONCELOS, S.M.M.; LIMA, N.M.; SALES, G.T.M.; PATROCÍNIO, M.C.A.; OLIVEIRA, G.R.; SOUSA, F.C.F.; VIANA, G.S.B. Efeitos da sulpirida sobre a densidade de receptores dopaminérgicos D₂-símile em corpo estriado de ratos jovens e velhos. **Revista Eletrônica Pesquisa Médica**, v.1, n. 4, p. 15-20, 2007.

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

YADAVA, R.S.; SANKHWAR, M.L.; SHUKLA, R.K.; CHANDRA, R.; PANT, A.B.; ISLAM, F.; KHANNA, V.K. Attenuation of arsenic neurotoxicity by curcumin in rats. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 240, p. 367-376, 2009.

ZARRINDAST, M.R.; NASEHI, M.; POURNAGHSHBAND, M.; YEKTA, B.G. Dopaminergic system in CA1 modulates MK-801 induced anxiolytic-like responses. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 103, p. 102-110, 2012.

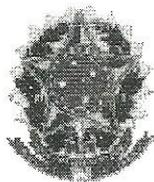
CONSIDERAÇÕES FINAIS

Na prospecção tecnológica realizada foi observado que existem poucas patentes de lipossomas para prevenção ou tratamento de doenças do sistema nervoso central. Nossa investigação revela a importância de incentivar pesquisa e desenvolvimento na área de nanotecnologia farmacêutica para prevenção e tratamento de tais doenças, as quais representam importantes problemas de saúde pública.

Os lipossomas foram capazes de melhorar a solubilidade da nimodipina. Os lipossomas contendo nimodipina apresentaram melhoria da capacidade antioxidante *in vitro* (DDPH, ABTS, superóxido e potencial redutor) com quantidade de fármaco muito inferior comparado com a nimodipina não encapsulada.

Por meio dos testes comportamentais claro-escuro, labirinto em cruz elevado, campo aberto e *rota rod*, foi observada atividade ansiolítica de lipossomas contendo nimodipina sem causar comprometimento da atividade locomotora e coordenação motora. E ainda, podemos sugerir que o LCNa pode exercer seu mecanismo de ação ansiolítico por meio de receptores serotoninérgicos, 5-HT_{1A} e dopaminérgicos, D₂.

ANEXOS

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

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

Teresina, 20 de setembro de 2011.

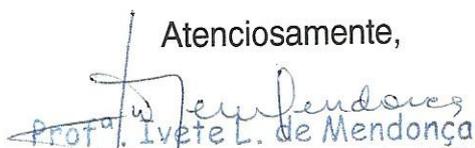
Ao (A)

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

Sr. (a) Pesquisador (a)

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

Atenciosamente,


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

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



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

DECLARAÇÃO

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

Hercília Maria Lins Rolim Santos

Gizelle Zayra da Silva de Oliveira

Lina Clara Gayoso e Almendra Ibiapina Moreno

Isabella Macário Ferro Cavalcanti

Nereide Stela Santos Magalhães

Rivelilson Mendes de Freitas

Teresina, 23 de agosto de 2012.

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