

GABRIELA DA ROCHA LINDNER

**DESENVOLVIMENTO DE NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS CONTENDO
RESVERATROL E AVALIAÇÃO DA AÇÃO NEUROPROTETORA SOBRE UM
MODELO EXPERIMENTAL DE DOENÇA DE PARKINSON**

**GUARAPUAVA
2014**

GABRIELA DA ROCHA LINDNER

**DESENVOLVIMENTO DE NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS CONTENDO
RESVERATROL E AVALIAÇÃO DA AÇÃO NEUROPROTETORA SOBRE UM
MODELO EXPERIMENTAL DE DOENÇA DE PARKINSON**

Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas, Curso de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, área de concentração fármacos, medicamentos e biociências aplicadas à farmácia, da Universidade Estadual do Centro-Oeste - UNICENTRO.

Orientador: Prof^ª. Dr^ª. Rubiana Mara Mainardes.

Co-orientador: Prof. Dr. Najeh Maissar Kalil

GUARAPUAVA

2014

Catálogo na Publicação
Biblioteca Central da Unicentro, Campus Cedeteg

L747d Lindner, Gabriela da Rocha
Desenvolvimento de nanopartículas poliméricas contendo Resveratrol e avaliação da ação neuroprotetora sobre um modelo experimental de doença de Parkinson / Gabriela da Rocha Lindner. -- Guarapuava, 2014
xxi, 125 f. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual do Centro-Oeste, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, área de concentração em Fármacos, Medicamentos e Biociências Aplicadas à Farmácia, 2014

Orientadora: Rubiana Mara Mainardes
Co-orientador: Najeh Maissar Kalil
Banca examinadora: Paulo Vitor Farago, Adriana Pohlmann, Rubiana Mara Mainardes

Bibliografia

1. Ciências farmacêuticas. 2. Nanopartículas. 3. Resveratrol. 4. Antioxidante. 5. MPTP. 6. Doença de Parkinson. I. Título. II. Programa de Pós-Graduação em Ciências farmacêuticas.

CDD 616.854

Este trabalho é dedicado aos meus pais, Aldanei e João Carlos Lindner, e ao meu irmão Carlos Eduardo pelo incentivo, apoio, paciência e principalmente pelo amor que recebo incansavelmente dia após dia.

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora, Prof^a. Dr^a. Rubiana Mara Mainardes e ao co-orientador Prof. Dr. Najeh Maissar Khalil, por serem grandes mestres e companheiros de caminhada. Muito obrigada pela oportunidade e confiança durante os 4 anos que trabalhamos juntos.

Ao Prof. Dr. Marcelo Farina, e todo o seu grupo de trabalho do Laboratório de Bioquímica da Universidade Federal de Santa Catarina, principalmente aos amigos Danúbia Bonfanti Santos, Dirleise Colle, Eduardo Luiz Gasnhar Moreira, pelo apoio durante todo o estudo lá realizado.

Ao Prof. Dr. Paulo Vitor Farago, por todas as vezes que esteve presente para ajudar nosso grupo de estudos, pelas leituras críticas e pelo estusiamo presente em cada explicação dada.

Aos professores do Programa de Pos-graduação em Ciências Farmacêuticas por todo o conhecimento transmitido. Principalmente ao professor e amigo Emerson Carraro, pela amizade, e incentivo durante todo o mestrado.

As colegas de pós-graduação e grandes amigas Lualís Edi David, Verônica Ambrosini, Clescila Altmeyer, Silvana Watanabe, Talita M. Moraes Carraro, Juliane Almeida, Leni Macedo Semaan, pelas discussões nos laboratórios, e pelas conversas e risadas trocadas fora da universidade. Sem vocês realmente a jornada teria sido muito mais difícil.

A minha família, que esteve ao meu lado em todos os momentos fossem eles bons ou ruins.

À CAPES pela bolsa concebida.

*“O cientista não é o homem que fornece as
verdadeiras respostas; é quem faz as verdadeiras perguntas”.*
(Claude Lévi-Strauss)

SUMÁRIO

1. REVISÃO DA LITERATURA	17
1.1 A passagem de fármacos pela barreira hematoencefálica	17
1.2 Nanotecnologia farmacêutica	20
1.3 Nanopartículas poliméricas	22
1.4 Resveratrol.....	28
2. OBJETIVOS.....	35
2.1 Objetivos gerais	35
2.2 Objetivos específicos	35
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	36
3.1 Substâncias e reagentes	36
3.1.1 Fármaco	36
3.1.2 Validação do Método Analítico	36
3.1.3 Produção das nanopartículas.....	36
3.1.4 Avaliação dos efeitos neuroprotetores das nanopartículas de PLA-P80 carregadas com RVT em um modelo experimental de Doença de Parkinson	Erro!
Indicador não definido.	
3.1.5 Outros reagentes e solventes.....	37
3.2 Equipamentos e acessórios	37
3.3 Procedimento experimental	38
3.3.1 Desenho experimental	38
3.3.2 Validação do método analítico para quantificação do RVT presente nas nanopartículas.....	39
3.3.2.1 Condições cromatográficas	40
3.3.2.2 Preparação das soluções-padrão, controles de qualidade e amostras	40
3.3.2.3 Validação do método cromatográfico.....	40
3.3.3 Preparação dos sistemas nanoparticulados	42

3.3.3.1	Preparação das nanopartículas de PLA e PLA-PEG contendo resveratrol.....	42
3.3.3.2	Preparação de nanopartículas de PLA-P80 contendo resveratrol	43
3.3.4	O estudo de delineamento fatorial.....	43
3.3.5	Caracterização físico-química das nanopartículas	45
3.3.5.1	Análise do diâmetro das nanopartículas	45
3.3.5.2	Determinação da eficiência de encapsulação	45
3.3.5.3	Potencial zeta	46
3.3.5.4	Espectroscopia na região do infravermelho	46
3.3.5.5	Ensaio de difração de raios X.....	46
3.3.6	Aplicabilidade das nanopartículas.....	48
3.3.6.1	Avaliação <i>in vitro</i> da atividade antioxidante de nanopartículas de RVT	48
3.3.6.2	Avaliação dos efeitos comportamentais e neuroprotetores das nanopartículas de PLA-P80 carregadas com RVT em um modelo experimental <i>in vivo</i> da Doença de Parkinson.....	49
3.3.6.2.1	Animais	50
3.3.6.2.2	Administração de nanopartículas de PLA-P80 com RVT pela via intraperitoneal.....	50
3.3.6.2.3	Administração intranasal de MPTP	51
3.3.6.2.4	Desenho experimental.....	51
3.3.6.2.5	Análises Comportamentais – discriminação olfatória e reconhecimento Social.....	53
3.3.6.2.6	Medida da peroxidação lipídica.....	54
3.3.6.2.7	Eletroforese seguida de imunodeteção de proteínas tirosina hidroxilase (<i>Western Blot</i>).....	54
3.3.6.2.8	Determinação das proteínas.....	55
3.3.6.2.9	Análise estatística.....	55
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	56

4.1 Validação do método analítico para quantificação do RVT nas nanopartículas	56
4.1.1 Desenvolvimento do método cromatográfico	56
4.1.2 Validação do método	57
4.1.2.1 Linearidade	57
4.1.2.2 Exatidão	58
4.1.2.3 Precisão	58
4.1.2.4 Robustez	59
4.1.2.5 Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)	60
4.1.2.6 Especificidade	61
4.2 Preparação de sistemas nanoparticulados contendo RVT	64
4.3 Delineamento fatorial	64
4.3.1 Análise do diâmetro das nanopartículas de PLA e PLA-PEG	64
4.3.2 Influência dos fatores da composição frente ao diâmetro de nanopartículas de PLA	66
4.3.3 Influência dos fatores da composição frente ao diâmetro de nanopartículas de PLA-PEG	70
4.3.4 Determinação da eficiência de encapsulação de nanopartículas de PLA e PLA-PEG	73
4.3.5 Influência dos fatores da composição frente à eficiência de encapsulação de nanopartículas de PLA	75
4.3.6 Influência dos fatores da composição frente à eficiência de encapsulação de nanopartículas de PLA-PEG	78
4.3.7 Formulação otimizada	80
4.4 Caracterização físico-química das nanopartículas com formulação otimizada	81
4.4.1 Potencial zeta	81
4.4.2 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho	82
4.4.3 Ensaio de difração de raios x	85

4.5	Aplicabilidade das nanopartículas poliméricas contendo resveratrol.....	90
4.5.1	Estudo do potencial antioxidante	90
4.5.2	Avaliação dos efeitos neuroprotetores das nanopartículas de PLA-P80 carregadas com RVT em um modelo experimental de Doença de Parkinson	93
4.5.2.1	Análises comportamentais	93
4.5.2.3	Estimativa da peroxidação lipídica - TBARS.....	96
4.5.2.4	Tirosina hidroxilase - TH	98
5.	CONCLUSÕES	100
	REFERÊNCIAS	102

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação dos transportes específicos através da barreira hematoencefálica	18
Figura 2 - Tipos de sistemas nanométricos utilizados para a liberação controlada de fármacos	21
Figura 3 - Subdivisão das nanopartículas em sistemas matriciais: nanoesferas (acima) ou sistemas reservatórios: nanocápsulas (abaixo)	24
Figura 4 - Representação esquemática de algumas técnicas destinadas à produção de nanopartículas poliméricas, aquelas a partir de polímeros pré-formados, e, aquelas a partir de monômeros	25
Figura 5 - Estrutura química do poli(ácido láctico) (PLA).....	26
Figura 6 - Sistemas poliméricos constituídos por polímero circundados por cadeias de PEG (acima). Dois tipos de estruturas podem ser produzidas, nanoesferas e nanocápsulas. Na mesma figura pode ser observado como são formadas as ligações PEG ao polímero PLA (abaixo).....	27
Figura 7 - Estrutura química do <i>trans</i> e <i>cis</i> RVT. A forma <i>trans</i> é relativamente estável, sendo a forma <i>estérica</i> predominante na natureza	29
Figura 8 - Fluxograma ilustrativo das etapas desenvolvidas nesta pesquisa.....	39
Figura 9 - Representação ilustrativa do método de simples emulsão- evaporação do solvente	42
Figura 10 - Estabilização do radical ABTS• ⁺ por um antioxidante (coloração verde-claro) e sua formação com persulfato de potássio (coloração verde-escuro).....	48
Figura 11 - Desenho experimental dos procedimentos realizados e testes comportamentais avaliados no modelo experimental de Doença de Parkinson em camundongos, por meio da administração intranasal de MPTP.....	52
Figura 12 - Cromatograma representativo (absorvância (AU) em função do tempo (min)) de RVT (30 µg/ mL) em metanol: água. Fase móvel metanol: água (51:49), fluxo de 0,9 mL/min; detecção no comprimento de onda de 306 nm, temperatura da coluna de 25°C, volume de injeção de 20 µL.....	56
Figura 13 - Curva analítica do RVT em metanol:água (50:50, v/v). Fase móvel metanol-água (51:49) em 306 nm.....	57

Figura 14 - Curva analítica para o LD e LQ (área do pico vs. concentração de RVT). O slope da curva (S), o desvio padrão do intercepto em y (σ) e o coeficiente de determinação (R^2) são relatados (n = 3).....	61
Figura 15 - Comparação dos cromatogramas de amostras de RVT frente a potenciais interferentes, componentes da formulação das nanopartículas. Em A observa-se o cromatograma de uma amostra de RVT proveniente do sobrenadante de nanopartículas. Em B, análise do cromatograma do sobrenadante obtido a partir das nanopartículas em branco.....	62
Figura 16 - Cromatogramas obtidos após a análise de amostras de RVT (30 μ g) submetidas a condições de estresse. Em (a) pode-se observar o cromatograma da amostra exposta às condições alcalinas e, em (b), a comparação entre os cromatogramas resultantes da análise antes e depois da exposição à luz visível.....	63
Figura 17 - Gráficos de superfície de resposta sobre o tamanho médio das nanopartículas de PLA: (a) efeito da proporção entre a fase aquosa e orgânica e tipo do solvente, (b) o efeito da porcentagem de tensoativo e razão entre a fase aquosa orgânica, (c) o efeito da porcentagem de tensoativo e tipo de solvente. Gráficos de superfície de resposta sobre o tamanho médio das nanopartículas de PLA-PEG: (d) efeito da relação entre fase aquosa e orgânica e o tipo de solvente, (e) o efeito da porcentagem de tensoativo e razão entre aquosa e fase orgânica, (f) efeito da porcentagem de tensoativo e tipo de solvente.	68
Figura 18 - Gráfico de superfície resposta sobre a EE% em nanopartículas de PLA: (a) efeito da proporção entre a fase aquosa e orgânica e o tipo do solvente, (b) efeito da porcentagem de tensoativo e razão entre a fase aquosa e orgânica, (c) efeito da porcentagem de tensoativo e do tipo de solvente, (d) efeito da proporção entre a fase aquosa e orgânica e o tipo do solvente, (e) efeito da porcentagem de tensoativo e a razão entre a fase aquosa e orgânica, (f) o efeito da porcentagem de tensoativo e tipo de solvente.....	77
Figura 19 - Espectro de FT-IR das amostras: (a) polímero PLA, (b) fármaco RVT, (c) polímero PEG, (d) tensoativo P80.....	84
Figura 20 - Espectro de FT-IR das amostras: (e) nanopartícula de PLA-P80 carregada com RVT, (f) nanopartícula de PLA-PEG carregada com RVT (g) mistura física de PLA, PEG e RVT, (h) nanopartícula de PLA carregada com RVT	85

Figura 21 - Difratoogramas de (a) PLA, (b) PEG, (c) RVT livre (d) nanopartículas de PLA-P80 (e) nanopartículas de PLA-PEG e (f) nanopartículas de PLA	86
Figura 22 - Porcentagem de liberação acumulada <i>in vitro</i> de RVT a partir de nanopartículas de PLA, PLA-PEG e PLA-P80 em solução de PBS a $37 \pm 0,5$ °C. Em (a), é mostrado o perfil de liberação de RVT em 24 h. Em (b), é mostrado o perfil de liberação de RVT em 72 h. Os dados representam a média \pm DP (n = 2).	88
Figura 23 - Efeitos do tratamento com RVT livre e nanoparticulado (20 mg/kg/dia durante 15 dias) na capacidade de discriminação olfatória de camundongos C57BL/6 que receberam MPTP (i.n., 1 mg/narina).	94
Figura 24 - Efeitos do tratamento (durante 15 dias consecutivos) com controle, RVT ou nanopartículas de PLA-P80 carregadas com RVT (20 mg/kg, i.p.) na memória de reconhecimento social de camundongos C57BL/6, 7 dias depois de infusão de MPTP (1 mg / narina).....	96
Figura 25 - Efeitos do RVT livre, nanopartículas de PLA-P80 contendo RVT e do MPTP nos nível de peroxidação lipídica no estriado de camundongos C57BL/6	97
Figura 26 - Análise por Western blot nos níveis da proteína tirosina hidroxilase (TH) no estriado de camundongos machos C57BL/6 tratados com RVT, RVT em nanopartículas de PLA-P80 e/ou MPTP	99

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Alguns produtos baseados na nanotecnologia que estão sendo testados ou aprovados.....	22
Tabela 2 - Parâmetros utilizados no estudo de delineamento fatorial.....	44
Tabela 3 - Diferentes formulações utilizadas para a produção de nanopartículas de PLA e blendas de PLA-PEG segundo o delineamento fatorial 3x2.	44
Tabela 4 - Equações matemáticas para os modelos utilizados para descrever as características de liberação de nanopartículas PLA, PLA-PEG e PLA-P80 carregados com RVT	48
Tabela 5 - Divisão de grupos utilizados para o experimento de avaliação dos efeitos comportais e neuroprotetores das nanopartículas de PLA-P80 contendo RVT em um modelo experimental da Doença de Parkinson.....	52
Tabela 6 - Porcentagem de recuperação e DPR obtida a partir da análise de exatidão .	58
Tabela 7 - Ensaio de precisão para as análises do RVT	59
Tabela 8 - Porcentagem de recuperação e DPR obtido nas análises de robustez após modificações na temperatura original do método (25°C) e coluna (n=3).....	60
Tabela 9 - Resultados obtidos após a exposição das soluções padrão de RVT à condições de estresse	63
Tabela 10 - Valores do diâmetro médio e índice de polidispersão (entre parêntesis) das nanopartículas de PLA e PLA-PEG.....	65
Tabela 11 - Desdobramento dos graus de liberdade realizado no estudo da influência dos fatores de formulação sobre o diâmetro das nanopartículas de PLA carregadas com RVT.....	67
Tabela 12 - Desdobramento dos graus de liberdade no estudo da influência dos fatores de formulação sobre o diâmetro das nanopartículas de blendas de PLA-PEG carregadas com RVT	71
Tabela 13 - Valores de eficiência de encapsulação de RVT nas suspensões das nanopartículas	74
Tabela 14 - Desdobramento dos graus de liberdade realizado no estudo da influência dos fatores de formulação sobre a EE% das nanopartículas de PLA carregadas com RVT.....	75
Tabela 15 - Desdobramento dos graus de liberdade no estudo da influência dos fatores de formulação sobre a EE% das blendas de PLA-PEG carregadas com RVT.....	78

Tabela 16 - Diferenças absolutas entre as médias da EE% de nanopartículas de PLA e PLA-PEG carregadas com RVT, obtidos nos lotes que receberam tratamento com 1% de tensoativo (PVA) e razão entre fase aquosa:orgânica 3:1	81
Tabela 17 - Análise do potencial zeta das dispersões coloidais preparadas na ausência e na presença de RVT dispersas em água	82
Tabela 18 - Análise cinética da liberação de RVT a partir de nanopartículas de PLA, PLA-PEG e PLA-P80 em solução salina de tampão fosfato (50 mM, pH 7,4) adicionado de 1% de PVA.	89
Tabela 19 - Porcentagem de inibição do radical ABTS ^{•+} por nanopartículas de PLA, PLA-PEG e PLA-P80 em concentrações de 1, 5, 10, 20, 25 µM em 0, 24, 48 e 72 horas	92
Tabela 20 - IC ₅₀ referente às nanopartículas investigadas sobre a captura do radical ABTS ^{•+} em tampão fosfato de sódio 10 mM, pH 7,4, na ausência de luz e à temperatura ambiente $\lambda = 734\text{nm}$	93

LISTA DE ABREVIATURAS

ABTS	(2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolinona-6-ácido sulfônico))
AE	Acetato de etila
ANOVA	Análise de variância
APO E	Apolipoproteína E
BHE	Barreira hematoencefálica
CAT	Catalase
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CV%	Coefficiente de variação (em porcentagem)
DCM	Diclorometano
DMSO	Dimetil sulfóxido
DPR	Desvio-padrão relativo
DRX	Difração de raios X
DP	Doença de Parkinson
EE%	Eficiência de encapsulação (em porcentagem)
GPx	Glutathione peroxidase
GR	Glutathione reductase
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
ICH	International Conference on Harmonization
IP	Índice de polidispersividade
FT-IR	Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier
LD	Limite de detecção
LQ	Limite de quantificação
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MPTP	1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina
NPs	Nanopartículas
O/A	Óleo em água
OMS	Organização Mundial da Saúde
PLA	Poli(ácido láctico)
PBS	Tampão fosfato de sódio

PEG	Polietilenoglicol
P80	Polissorbato 80
PVA	Poli(álcool vinílico)
PZ	Potencial zeta
RVT	Resveratrol
SNC	Sistema nervoso central
TBARS	Substâncias que reagem ao ácido tiobarbitúrico
TH	Tirosina hidroxilase

RESUMO

Este trabalho visou o desenvolvimento de nanopartículas poliméricas como forma de carreamento do fármaco resveratrol (RVT). Este fármaco possui vários usos farmacológicos, incluindo ação antioxidante e neuroprotetora. Entretanto, sua ação terapêutica ou profilática é prejudicada pelo seu conjunto de características físico-químicas que apresenta baixa solubilidade em meios aquosos, e, ainda, é amplamente metabolizado em curto período de tempo, resultando em uma baixa biodisponibilidade e ineficaz alcance aos seus sítios de ação. Nanopartículas de poli(ácido láctico) (PLA), PLA-poli(etilenoglicol) (PLA-PEG) and PLA-polissorbato 80 (PLA-P80) contendo RVT foram desenvolvidas pelo método de emulsão-evaporação do solvente. Para isso, um delineamento fatorial foi desenvolvido, objetivando a análise da influência dos fatores da formulação, razão entre fases aquosa e orgânica, composição do solvente e concentração de tesoativo utilizado, sobre as características de diâmetro e eficiência de encapsulação do fármaco (EE%) das nanopartículas, além de propiciar informações para o desenvolvimento de uma formulação final otimizada. Um método analítico utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com detecção de arranjo de fotodiodo (PDA) foi desenvolvido e validado com a finalidade de permitir uma confiável determinação da EE% das nanopartículas. A fase móvel do método consistiu de metanol:água (51:49), fluxo de 0,9 mL/min com detecção em 306 nm. Este método apresentou especificidade, linearidade, precisão, exatidão, limites de detecção e quantificação e robustez satisfatórios de acordo com as recomendações vigentes. Os sistemas compostos por PLA, PLA-PEG e PLA-P80 apresentaram médias de diâmetro e EE% de 227,57 nm e 82,47%, 185,47 nm e 75,67% e 174,7 nm e 76,88%, respectivamente. O estudo de liberação *in vitro* demonstrou que o RVT foi liberado mais lentamente quando nas nanopartículas e, os dados de liberação *in vitro* sugerem uma cinética do tipo Higuchi para ambas as nanoformulações e o coeficiente de Kossmeyer-Peppas indicou que o transporte anômalo foi o principal mecanismo de liberação do RVT. A aplicabilidade das nanopartículas foi analisada através do estudo do potencial antioxidante dos sistemas contendo RVT frente à capacidade sequestrante do radical (2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolinona-6-ácido sulfônico)) (ABTS^{•+}). Todas as formulações mantiveram um potencial de ação expressivo. Ao final de 72 horas, as nanopartículas de PLA e PLA-P80 apresentaram semelhantes IC₅₀, próximos a 16 µM de

RVT e as nanopartículas de PLA-PEG demonstraram semelhança ao IC₅₀ do fármaco livre, 12,761 $\mu\text{M} \pm 0,792$ e 11,148 $\mu\text{M} \pm 0,344$, respectivamente. Foi investigado também, o potencial neuroprotetor do RVT contido ou não nas nanopartículas de PLA-P80 (20 mg/kg/dia durante 15 dias, intraperitonealmente) frente a um modelo experimental de Doença de Parkinson induzido por 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP) em camundongos C57BL/6. Esta formulação foi selecionada por permitir uma melhor passagem do sistema pela barreira hematoencefálica. Os dados de avaliação comportamental dos animais, aliados aos resultados obtidos por meio análises de níveis de peroxidação lipídica (TBARS) e níveis de proteínas Tirosina Hidroxilase (TH) em tecidos estriatais dos animais, apontaram uma neuroproteção quando utilizado o RVT carregado pelas nanopartículas e o mesmo não foi encontrado com as amostras provenientes de animais tratados com o fármaco livre. Sendo assim, o conjunto de resultados demonstrou que os sistemas carreadores de RVT, produzidos com PLA, PLA-PEG e PLA-P80 possuem alta eficiência de encapsulação, diâmetro reduzido e são capazes de manter a atividade antioxidante do fármaco. Em adição, as nanopartículas de PLA-P80 demonstraram potencializar a ação neuroprotetora relacionada ao RVT.

Palavras-Chave: Nanopartículas, Resveratrol, antioxidante, MPTP, Doença de Parkinson.

ABSTRACT

This study aimed at developing polymeric nanoparticles containing resveratrol (RVT). This drug has several pharmacological uses, including antioxidant and neuroprotective effects. However, the therapeutic effect is reduced due to its physico-chemical characteristics of low solubility in aqueous media and an extensively metabolization in a short time which results in a low bioavailability and ineffective amount in its active sites. Poly(lactic acid) (PLA), PLA-poly(ethylene glycol) (PLA-PEG) and PLA-Polisorbate 80 (PLA-P80) nanoparticles containing resveratrol (RVT) were obtained by emulsion-solvent evaporation method. A factorial design was carried out in order to investigate the influence of the formulation (ratio of aqueous to organic phase, surfactant concentration and solvent composition) on diameter and drug encapsulation efficiency (EE%). The factorial design was used in order to provide the best final formulation. An analytical method using high performance liquid chromatography (HPLC) / photodiode array (PDA) detection was developed and validated for RVT determination in nanoparticles. The mobile phase consisted of methanol:water (51:49) flowed at 0.9 mL/min with PDA detector set at 306 nm. This method had a suitable specificity, linearity, precision, accuracy, limits of detection and quantification and robustness according to current guidelines. PLA, PLA-PEG and PLA-P80 nanoparticles showed mean diameter and EE% of 227.57 nm and 82.47%, 185.47 nm and 75.67%, and 174.7 nm and 76.88%, respectively. The *in vitro* release study showed that RVT was released more slowly from PLA nanoparticles than PLA-PEG nanoparticles. The *in vitro* release data were best-fitted by the Higuchi kinetics for both nanoformulations and the Kossmeyer-Peppas coefficient indicated that anomalous transport was the main release mechanism for RVT. The nanoparticles applicability was analyzed by studying the antioxidant potential of RVT-loaded formulations regarding their ability to scavenge the radical (2,2-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt) (ABTS^{•+}). All formulations kept a significant antioxidant potential. At the end of 72 hours, PLA and PLA-P80 nanoparticles had similar IC₅₀ close to 16 µM of RVT. On the other hand, the PLA-PEG nanoparticles led to IC₅₀ values similar to the free drug, 12.761 ± 0.792 µM and 11.148 ± 0.344 µM, respectively. Furthermore, the neuroprotective potential of RVT-loaded PLA-P80 nanoparticles and free drug (20 mg/kg/day for 15 days, intraperitoneally) was

investigated using an experimental model of Parkinson's Disease induced by the 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridine (MPTP) using C57BL/6 mices. A neuroprotection was demonstrated by behavioral data, lipid peroxidation (TBARS) levels, and tyrosine hydroxylase protein (TH) levels in striatal tissue of mices using formulation PLA-P80_RVT. However, free drug provide no neuroproteccion. In summary, RVT-loaded formulation prepared with PLA, PLA-PEG and PLA-P80 have high encapsulation efficiency, small diameter and are able to keep the antioxidant activity of the drug. In addition, PLA-P80 nanoparticles provide a remarkable neuroprotective effect related to RVT.

Keywords: Nanoparticles, Resveratrol, antioxidant, MPTP, Parkinson's Disease.

1. REVISÃO DA LITERATURA

1.1 A passagem de fármacos pela barreira hematoencefálica

O aumento da sobrevivência da população na atualidade traz consigo um aumento nos casos de distúrbios neurológicos, que já se apresentavam, no ano de 2006, como 6,3% do total de doenças da população (WHO, 2006). Doenças neurológicas são altamente associadas à incapacidade crônica ou ao declínio das funções neurológicas, o que resulta em sofrimento significativo aos pacientes e seus cuidadores, além de gerar altos custos econômicos. Em 2010, as doenças neurológicas que levaram à demência geraram um impacto global econômico de mais de 600 bilhões de dólares (ABBOTT, 2011). Além das disfunções neurológicas, os tumores cerebrais também são um profundo problema clínico. Segundo a Associação Americana de Tumores Cerebrais (www.abta.org/news/brain-tumor-fact-sheets), durante o ano de 2010, nos Estados Unidos, mais de 688 mil pessoas viviam com o diagnóstico de algum tumor no sistema nervoso central (SNC), e dentre eles, mais de 138 mil pessoas estavam vivendo com um tumor maligno. No Brasil, no ano de 2008, estes casos chegaram a 8.461, sendo que a razão mortalidade/incidência chegou a média de 92% (INCA, 2012).

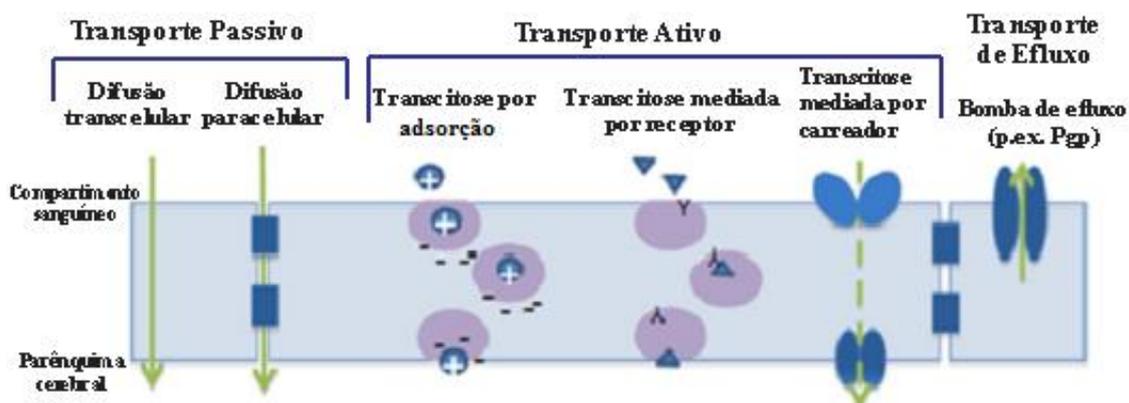
Considerando o substancial impacto à saúde pública, esforços significativos da pesquisa farmacológica vêm sendo direcionados ao desenvolvimento de novos fármacos e, principalmente, ao direcionamento ao SNC. Porém, apesar dos esforços, os tratamentos permanecem limitados devido à incapacidade dos agentes farmacológicos atravessarem a barreira hematoencefálica (BHE) em concentrações terapêuticas (REESE & KARNOVSKY, 1967; PATEL et al, 2012).

Conceituada originalmente por Paul Ehrlich em 1885, a BHE é composta, principalmente, por células endoteliais polarizadas que revestem a microvasculatura cerebral e os elementos perivasculares circundantes. Essas células possuem poucas vias de transporte alternativos (por exemplo: fenestras, canais transendoteliais, vesículas pinocitóticas) e formam plexos com as proteínas transmembranares (claudina, ocludina e moléculas de adesão juncional) e citoplasmáticas (zonas oclusivas 1, 2 e 3 e cingulinas), formadoras das junções apertadas (*tight junctions*) que restringem fortemente a difusão paracelular de moléculas solúveis em água a partir do sangue ao cérebro (HAWKINS & DAVIS, 2005; GABATHULER, 2010).

Além das células endoteliais e das junções apertadas, a BHE está intimamente ligada aos astrócitos e perócitos que contribuem através de altas taxas metabólicas e fagocíticas, a um conjunto de enzimas intra e extracelulares que inativam a tentativa de substâncias endógenas de ultrapassar a BHE (NUNES, AL-JAMAL & KOSTARELOS, 2012) e a um grande número de transportadores de efluxo. Estes podem bombear as pequenas moléculas lipofílicas que obtiveram sucesso na difusão por entre as células endoteliais. Entre esses transportadores, a glicoproteína P (Pgp) possui alta propensão à eliminar drogas antitumorais e antibióticos (SCHINKEL, 1999). Por fim, a grande maioria das moléculas só alcança o cérebro quando ligada à transportadores específicos ou receptores expressos no lado luminal das células endoteliais (SCHINKEL, 1999).

A Figura 1 mostra, resumidamente, as possíveis vias de transporte através da BHE, entre elas: a) via paracelular aquosa, altamente restringida pelas junções apertadas, b) via transcelular lipofílica, c) proteínas específicas de transporte, muito utilizadas por aminoácidos, glicose e outras moléculas essenciais à sobrevivência das células do cérebro, d) receptor de transcitose, relacionados principalmente à transferência de moléculas maiores e hidrofílicas essenciais, tais como hormônios, ferro, insulina e lipoproteína, e) transcitose mediada por adsorção (PATEL et al, 2012; NUNES, AL-JAMAL & KOSTARELOS, 2012). Entretanto, devido à natureza e a especificidade restritiva da BHE entre todos os fármacos destinados a distúrbios neurológicos, 98% não ultrapassam a BHE sendo apenas os candidatos altamente lipofílicos com massa molecular menor que 400 Da promissores fármacos destinados ao SNC (PARDRIDGE, 2001, ALAM et al, 2010).

Figura 1 - Representação dos transportes específicos através da barreira hematoencefálica.



(Adaptado de NUNES, AL-JAMAL & KOSTARELOS, 2012)

As estratégias utilizadas para a vetorização de fármacos ao SNC podem ser divididas em invasivas, fisiológicas ou farmacológicas. Os métodos invasivos podem utilizar-se do aumento reversível da permeabilidade da BHE (NEUWELT et al, 1979) a partir de agentes hiperosmolar ou agente bioquímicos como manitol (FORTIN et al, 2007), bradicinina e seus análogos (BORLONGAN & EMERICH, 2003). Esses agentes provocam um encolhimento transiente das células endoteliais cerebrais, o que leva a um pequeno espaçamento entre as junções apertadas resultando na permeabilidade da BHE (SERWER & JAMES, 2001), ou da infusão direta intraventricular ou intracerebral do agente (BOBO et al, 1994; CHAUHAN, 2002). Essas abordagens acarretam um rompimento temporário da BHE ou danos diretos à sua integridade, o que elevam o custo do tratamento, o tempo de recuperação, além disso, requerem anestesia, internação e obviamente correlaciona-se com elevado risco de complicações, tais como infecções intracranianas e edemas cerebrais (WOHLFART, GELPERINA & KREUTER, 2012).

A estratégia fisiológica se baseia na utilização de transportadores específicos ou mecanismos de transporte de substâncias essenciais para o metabolismo e sobrevivência, tal como a glicose, insulina, hormônio do crescimento e lipoproteína de baixa densidade. A modificação de um fármaco a fim de tirar vantagem de um sistemas próprio de transporte da BHE ou, então, a conjugação à ligantes que podem ser reconhecidos por tais receptores, são estratégias de transporte de fármacos sobre a BHE reconhecidas pela comunidade científica como aquelas com maior possibilidade de sucesso (GABATHULER, 2010). Algumas limitações podem ser encontradas ao se utilizar os métodos fisiológicos, devendo se atentar a casos em que haja cinética disponível para o transporte do sistema e, principalmente, na manipulação dos compostos terapêuticos de modo que os compostos conjugados permaneçam ativos *in vivo*. Adicionalmente, a expressão generalizada em órgãos periféricos de alguns receptores, como é o caso de receptores de transferrina, limita a capacidade de entrega específica ao cérebro (GABATHULER, 2010).

As abordagens farmacológicas se concentram na modulação das características físico-químicas do agente terapêutico desfavoráveis à penetrância da molécula através da BHE. Entre essas características, a entrada no SNC possui uma intrínseca relação com a lipossolubilidade do fármaco (LEVIN, 1980). Assim, projetando-se uma droga altamente lipossolúvel, pode-se conseguir uma penetração melhorada pela BHE. Porém,

isso nem sempre é possível. Aumentar a solubilidade lipídica de uma molécula pode resultar em efeitos indesejáveis, tais como diminuir a solubilidade aquosa e biodisponibilidade, aumentar a ligação às proteínas plasmáticas ou a absorção pelo fígado e sistema reticuloendotelial (BEGLEY, 2004; BRADLEY et al, 2001) ou mesmo pode converter a molécula em questão, em um substrato para bombas de efluxo (GABATHULER, 2010; HARTZ & BAUER, 2011).

A procura por estratégias que possibilitem desviar as limitações encontradas em fármacos destinados ao SNC é crescente e atual, e consiste em um dos maiores desafios referentes à cura ou controle de doenças como Alzheimer, Parkinson e Huntington, além dos cânceres ligados ao SNC.

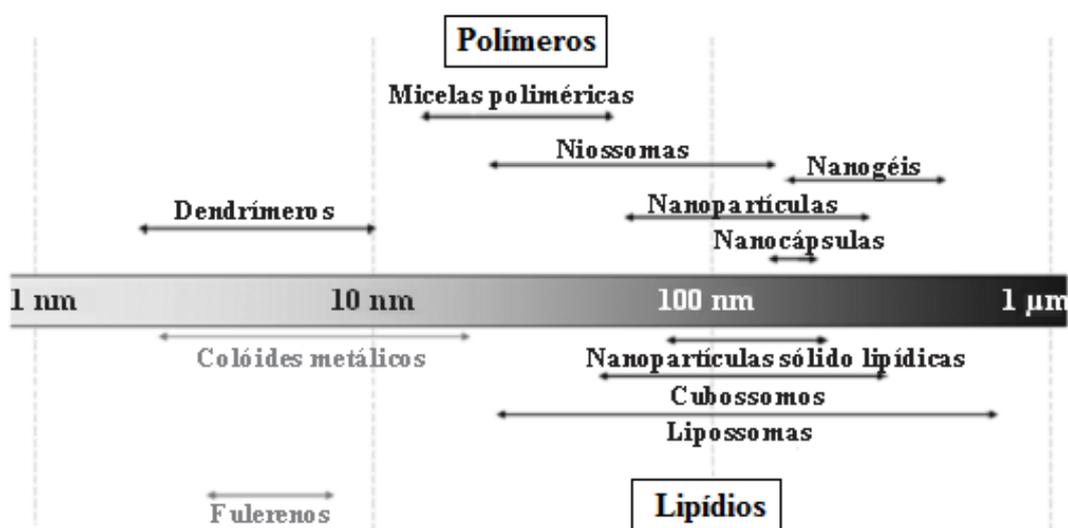
1.2 Nanotecnologia farmacêutica

Como resposta aos inconvenientes encontrados pela terapia convencional que, em muitos casos, limitam o alcance significativo do fármaco ao seu sítio de ação, grande parte dos tratamentos farmacológicos convencionais possui a necessidade da administração de grandes quantidades de princípio ativo para alcançar sua ação profilática ou curativa. Assim, é imprescindível a criação de estratégias que proporcionem a modulação da distribuição de fármacos, a fim de melhorar seu índice terapêutico (NAIR et al, 2010). Os sistemas utilizados para esse fim podem ser de natureza diversa, podendo tratar-se de mecanismos mais ou menos sofisticados, porém a maioria deles presa pela vetorização do fármaco, ou seja, a liberação do fármaco de forma preferencial no órgão ou célula-alvo, permitindo, deste modo, acentuar o efeito farmacológico e reduzir os efeitos colaterais adversos (NECKEL, 2006).

Dentre as principais estratégias vetoriais, incluem-se os sistemas nanoestruturados incluindo nanopartículas poliméricas (NPs), nanossuspensões, nanoemulsões, nanogéis, lipossomas e nanopartículas lipídicas sólidas (MAINARDES, GREMIÃO & EVANGELISTA, 2006). A nanotecnologia farmacêutica surgiu a partir de meados de 1960, quando o grupo de estudantes liderados por Gregoriadis (1974) e também o grupo de Bangham (1983) iniciavam estudos a partir de lipossomas. Esses sistemas serviram de base para a explosão de um grande número de nanodispositivos adequados à liberação de fármacos produzidos na sua grande maioria a partir de lípidios ou de compostos poliméricos (COUVREY & VAUTHIER, 2006). Mais recentemente,

novos sistemas de liberação de drogas com base em conjuntos diversificados de materias como o carbono também foram sugeridos (Figura 2) (BIANCO, COSTARELOS & PRATO, 2005).

Figura 2 - Tipos de sistemas nanométricos utilizados para a liberação controlada de fármacos



* Os eixos representam o diâmetro normalmente encontrado nesses sistemas. (Adaptado de COUVREUR & VAUTHIER, 2006).

Embora esta seja uma área relativamente nova, várias formulações já estão sendo comercializadas com sucesso e outras passam por ensaios clínicos. A tabela 1 reflete algumas das formulações desenvolvidas a partir da nanotecnologia farmacêutica que foram aprovadas ou estão em fase de ensaio clínico.

Tabela 1- Alguns produtos baseados na nanotecnologia que estão sendo testados ou aprovados

Produto	Tipo de nanomaterial	Indicação	Fase	Vantagens	Empresa
Doxil	Lipossomas PEGlados	Câncer de ovário e mieloma múltiplo	No mercado	Tempo de circulação aumentado em até seis vezes. Mais eficaz do que DOX livre	Janssen
Abraxame	Nanopartículas de albumina	Câncer de mama e pulmão	No mercado	Aumento da citotoxicidade, menor tempo de infusão e menor dose exigida	Cell gene Corporation/ Abraxis Biosciences
Nanoxel	Nanopartículas para liberação de paclitaxel	Câncer de mama e ovário	No mercado	Formulação solúvel em água e livre de Cremophor além de maior eficácia e citotoxicidade diminuída	Dabur Pharma
AuroShell	Nanopartículas de sílica revestidas com Au	Tumores sólidos	Fase I	Altamente seletivamente a destruição do tumor, com o mínimo de danos aos tecidos circundantes	Nanospectra Biosciences
ING N 401	Lipossomas	Câncer de pulmão metastático	Fase I	Suprime o crescimento do tumor e inibe a metástase de câncer de pulmão	Introgen
Aurimmune (CYT-6091)	Nanopartículas de Au acopladas a TNF e PEG-Tiol	Tumores sólidos	Fase II	Destrói seletivamente as células cancerosas sem danificar os tecidos saudáveis	CytImmune Sciences
TNT AntiEpCAM	Polímero revestido de óxido de ferro	Câncer de ovário e tumores sólidos	Pré-clínica	Fornece terapia-alvo. Ataca seletivamente células EpCam positivas	Triton BioSystems

(Adaptada de PARVEEN, MISRA & SAHOO, 2012 e reavaliados em: <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/drugsatfda/>).

1.3 Nanopartículas poliméricas

NPs são sistemas coloidais que variam entre 10 a 1000 nanômetros (QUINTANAR-GUERRERO et al, 1998) e, em geral, promovem liberação controlada e prolongada do fármaco veiculado, a partir da melhora de suas propriedades físico-químicas e biofarmacêuticas. O controle da liberação pode implicar na ampliação da capacidade de passagem do sistema por inúmeras barreiras fisiológicas, o qual representa um dos objetivos mais desafiadores a serem ultrapassados, quando se diz respeito a tratamentos farmacológicos (ALONSO, 2004).

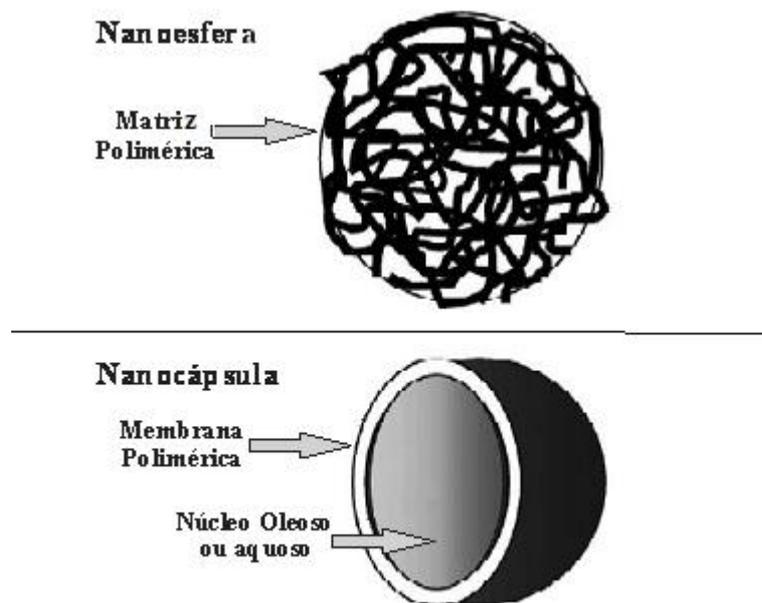
Além disso, as NPs oferecem vantagens ao tratamento medicamentoso como: maior estabilidade do fármaco no sangue, menor toxicidade, características não-

trombogênicas, não-imunogênicas, não-inflamatórias, melhores características de solubilidade aquosa ou lipofílica e melhoria da biodisponibilidade. Sendo assim, são compatíveis com a maioria das vias de administração, podendo resolver problemas ligados à adesão a terapia (PARVEEN, MISRA & SAHOO, 2012; KUMARI, YADAV & YADAV, 2010).

Somando-se às qualidades farmacológicas, as NPs apresentam vantagens adicionais à outros sistemas nanométricos, por possuir grande estabilidade, permitir o carreamento de grande quantidade de fármaco, proporcionar maior controle sobre a cinética de liberação do fármaco, permitir facilmente as modificações superficiais, possuir uma multiplicidade de métodos de produção e, por fim, propiciar segurança adicional, já que polímeros apresentam uma longa história de segura utilização *in vivo* (SOPPIMATH et al, 2001; OLIVIER, 2005; PATEL et al, 2012; KAYSER, LEMKE & HERNÁNDEZ-TREJO, 2005), sendo que aqueles utilizados na nanotecnologia farmacêutica, em grande parte, possuem características biodegradáveis e biocompatíveis (PARVEEN, MISRA & SAHOO, 2012).

Nanopartículas poliméricas é o nome coletivo dado tanto aos sistemas reservatórios, as nanocápsulas, onde um invólucro polimérico está disposto ao redor de um núcleo oleoso ou aquoso que serve como reservatório ao composto ativo, ou, às nanoesferas, sistemas matriciais que não possuem um núcleo, neste caso, o princípio ativo apresenta-se disperso sobre uma rede polimérica. Em ambos os casos, o fármaco pode estar aderido também a superfície polimérica (Figura 3) (QUINTANAR-GUERRERO et al, 1998; MAINARDES & EVANGELHISTA, 2005).

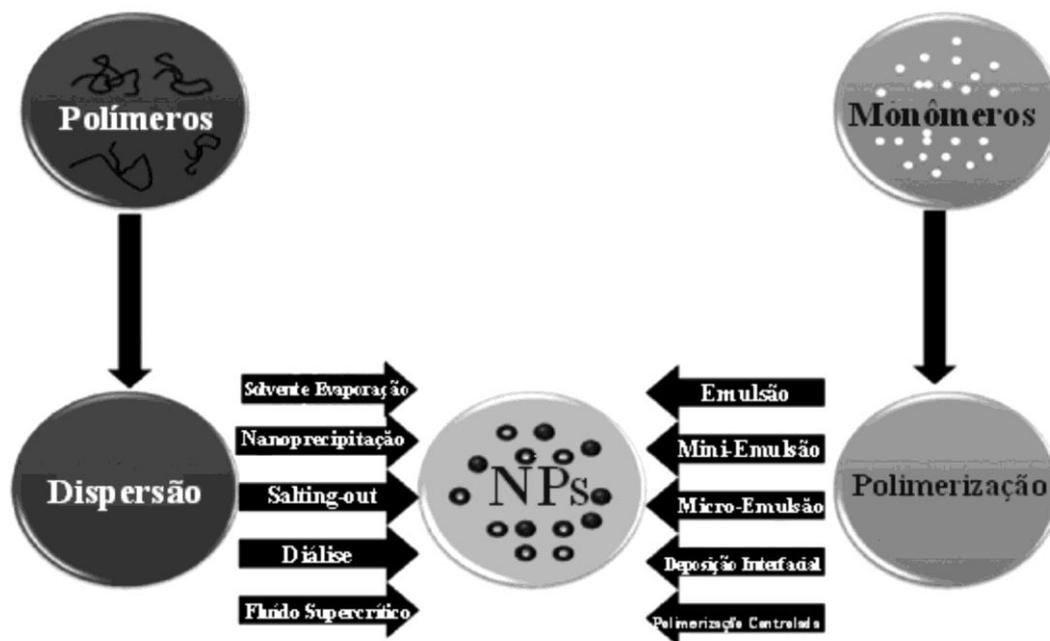
Figura 3 – Subdivisão das nanopartículas em sistemas matriciais: nanoesferas (acima) ou sistemas reservatórios: nanocápsulas (abaixo)



(Adaptado de BRIGGER, DUBERNET & COUVREUR, 2002).

As NPs poliméricas podem ser produzidas a partir da polimerização interfacial de monômeros, a qual pode englobar reações clássicas de poliadição e policondensação, ou, a partir da utilização de polímeros previamente formados (Figura 4). Quatro métodos provenientes de polímeros pré-formados estão disponíveis: emulsão-evaporação do solvente, difusão do solvente, emulsificação-difusão e *salting-out*. Essas técnicas são similares quanto aos procedimentos empregados, pois envolvem a preparação de uma solução orgânica contendo os componentes da nanopartícula e de uma solução aquosa contendo um estabilizante. Sua escolha deve ser feita com base nos fatores desejados, como tamanho, área de aplicação e tipo do polímero a ser utilizado (RAO & GECKELER, 2011; QUINTANAR-GUERRERO et al, 1998).

Figura 4 - Representação esquemática de algumas técnicas destinadas à produção de nanopartículas poliméricas, aquelas a partir de polímeros pré-formados, e, aquelas a partir de monômeros



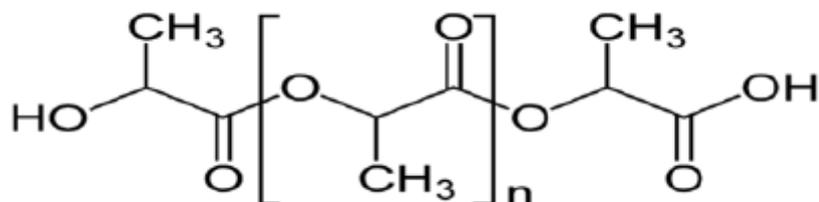
(Adaptado de RAO & GECKELER, 2011).

Polímeros sintéticos, tais como o poli(ácido láctico) (PLA), poli(ácido glicólico) (PGA), poli(ácido láctico-*co*-ácido glicólico) (PLGA), poli(*ε*-caprolactona), polietilenoglicol (PEG) e ácido(poliglutâmico), além de polímeros naturais, como quitosana e albumina, têm sido extensivamente estudados e utilizados, tanto para a formação de cápsulas ou esferas, quanto para o revestimento da partícula. Os polímeros sintéticos possuem como vantagem a elevada pureza, não necessitando passos adicionais de purificação, menor risco de toxicidade e maior reprodutibilidade quando comparados à polímeros naturais (PINTO REIS et al, 2006). Entre eles, os polímeros do grupo dos poliésteres são de grande interesse devido à compatibilidade e à biodegradabilidade em metabólitos não tóxicos.

O polímero PLA (Figura 5) é um poliéster aprovado pelo *Food and Drug Administration* (FDA) para uso humano (ASTETE, KUMAR & SABLIOV, 2007, KUMARI, YADAV & YADAV, 2010), é um material biocompatível e biodegradável que quando em meio fisiológico sofre cisão à sua forma monomérica, unidades de ácido láctico, e é incorporado ao ciclo de Krebs, como um composto intermediário, natural do metabolismo. Nanopartículas de PLA têm sido principalmente elaboradas por métodos

da emulsão-evaporação do solvente, nanoprecipitação, *salting out* e difusão do solvente (NECKEL & LEMOS, 2005; KUMARI YADAV & YADAV, 2010).

Figura 5 - Estrutura química do poli(ácido lático) (PLA)



n: número de meros/unidades formadoras

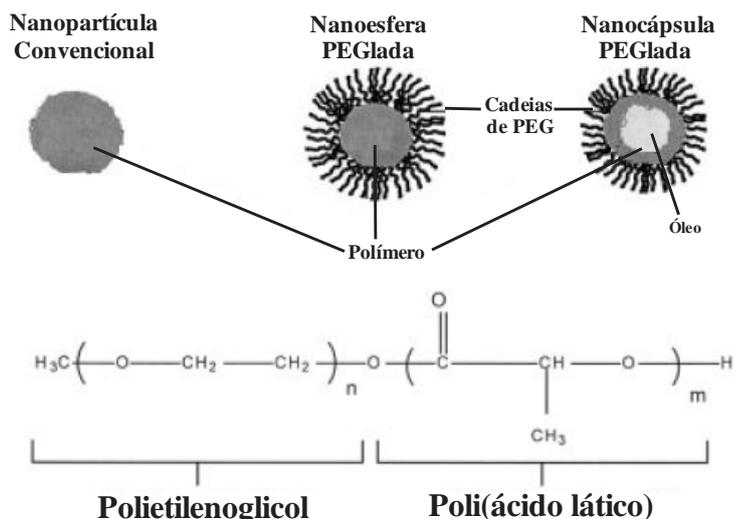
Vários estudos têm demonstrado a importância do emprego deste material polimérico no desenvolvimento de nanossistemas (KUMARI, KUMAR, & YADAV, 2012; HOU et al, 2011; XING, ZHANG & TAN, 2007). Entretanto, devido à sua característica hidrofóbica, o PLA torna a superfície da nanopartícula bastante acessível à opsonização e posterior fagocitose, sendo, grande parte, rapidamente removida do sistema circulatório após administração intravenosa, normalmente pelas células de Kupffer do fígado e macrófagos do baço, principais representantes do sistema fagocítico mononuclear (ILLUM, HUNNEYBALL & DAVIS, 1986). Esse aumento no poder de reconhecimento de moléculas não próprias ao organismo, quando hidrofóbica, dá-se pelo fato de que com raras exceções, as células *in vivo* possuem na sua superfície um glicocálice consistido de glicoproteínas e glicolipídios que frequentemente terminam em resíduos de ácido siálico, o que propicia as células uma superfície hidrofílica e carregada negativamente (ALLEN, 1994).

A fim de contornar tais inconvenientes e superar o processo de opsonização pelo sistema fagocítico mononuclear que limitaria a utilização terapêutica dos nanossistemas, nos últimos 20 anos aprimorou-se o conceito de modificação superficial e a formação de nanopartículas furtivas (*Stealth*) ao sistema fagocítico mononuclear. Esses processos podem se dar, a partir da adsorção ou ligação covalente de polímeros hidrofílicos na superfície dos colóides, modificação da carga superficial, tamanho, hidrofilicidade ou mudança da conformação do polímero (MOSQUEIRA et al, 2001).

Entre os polímeros capazes de reduzir drasticamente a interação com proteínas do sangue, o PEG (Figura 6), tem sido um dos mais investigados. Ele é um polímero

não-iônico que possui característica hidrofílica, e, por isso, menos imunogênica, e compatível com o meio gastrointestinal (OWENS, 2006), que pode ser adsorvido fisicamente ou ligado covalentemente à superfície dos coloides hidrofóbicos, ou, no caso de nanopartículas biodegradáveis, as cadeias de PEG podem ser incorporadas como copolímeros em toda a partícula de modo que cadeias de PEG estarão sempre disponíveis, mesmo após a degradação das camadas de superfície (MOSQUEIRA et al, 2001; OWENS, 2006). Além disso, as cadeias flexíveis desse polímero quando hidratadas, formam uma nuvem estérica que se estende a partir da partícula produzindo uma repulsão às proteínas plasmáticas (NEEDHAM et al, 1992(a); NEEDHAM, MCINTOSH & LASIC, 1992(b)).

Figura 6 - Sistemas poliméricos constituídos por polímero circundados por cadeias de PEG (acima). Dois tipos de estruturas podem ser produzidas, nanoesferas e nanocápsulas. Na mesma figura pode ser observado como são formadas as ligações PEG ao polímero PLA (abaixo)



n e m = número de meros (Adaptado de AMELLER et al, 2003).

Tensoativos aniônicos também são promissores modificadores superficiais para nanopartículas. Por possuírem característica anfifílica, diminuem a tensão superficial entre partícula e célula permitindo um maior contato entre elas. Além disso, uma grande maioria deles promove a liberação em sítios-alvo, efeito esse, dependente da natureza do tensoativo (estrutura química, físico-química, parâmetros bioquímicos, etc). Entre esses, destacam-se o efeito alvo dos polissorbatos 20, 40, 60 e, em especial 80 (KREUTER et al, 1997).

Borchard e colaboradores (1994) em um dos estudos pioneiros de direcionamento de nanopartículas ao cérebro, utilizou células cerebrais de microvasos endoteliais bovino para demonstrar o papel do revestimento de polissorbato 80 (P80) na liberação direcionada ao SNC. A partir disso, muitos trabalhos vêm confirmando a ação promissora do P80 no direcionamento cerebral de fármacos por meio de sistemas nanométricos. Olivier e colaboradores (1999) mostraram que nanopartículas poliméricas carregadas com dalarginina chegaram ao SNC em maior quantidade do que quando não-revestidos, além disso, a captação hepática, também foi diminuída. Huang e colaboradores (2008) também comprovaram o efeito de liberação-alvo, a partir do revestimento com P80 de nanopartículas poliméricas carregadas com gemcitabina após administração intravenosa em ratos saudáveis.

Várias explicações podem ser atribuídas à influência desse tensoativo sobre o transporte de moléculas e estruturas para o cérebro. A principal delas se refere à adsorção de proteínas plasmáticas, entre elas as apolipoproteínas E (APO E) na superfície de nanopartículas revestidas (LUCK, 1997). As APO E tratam-se de apolipoproteínas envolvidas no transporte de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) para o cérebro, moléculas essenciais ao SNC (BE'DUNEAU, SAULNIERA & BENOIT, 2007). Essa proteína, por sua vez, liga-se a uma série de receptores na BHE, como por exemplo, o receptor LDLR, LRP-1, receptor de VLDL, ApoER-2 e megalin/gp330, como também em receptores de outras partes do SNC. Assim, é provável que a presença da APO E na superfície das nanopartículas promova a internalização das nanopartículas via receptores da LDL (WOHLFART, GELPERINA & KREUTER, 2012).

1.4 Resveratrol

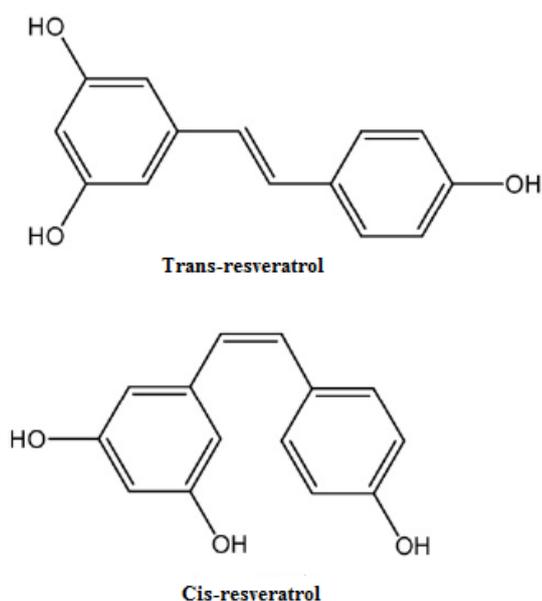
Uma infinidade de compostos naturais são conhecidos por apresentar propriedades farmacológicas modulando vias inflamatórias, antioxidantes, imunológicas apoptóticas e até mesmo angiogênicas. Entretanto, inicialmente, esses agentes foram amplamente modificados quimicamente, com a finalidade de aumentar a potência ou especificidade do farmacóforo (COIMBRA et al, 2011). Na atualidade, vive-se um contramovimento, no qual os compostos naturais são apreciados pelo seu amplo espectro de atividades, o que torna-os adequados ao tratamento de doenças

multifatoriais como o câncer, além de, em geral, melhorar o perfil toxicológico, ter melhor aceitação pelo público, e custo relativamente menor (GUPTA et al, 2010).

Entre os compostos naturais, ganha destaque, por possuir uma grande gama de ações farmacológicas, o resveratrol (3,5,4' tri-idroxiestilbeno; RVT), um polifenol encontrado em mais de 70 espécies vegetais, incluindo aqueles que fazem parte da dieta humana diária, como amendoins, uvas e plantas aromáticas (KRISTL et al, 2009; LU et al, 2009).

O RVT é uma fitoalexina formada por dois anéis aromáticos unidos por um grupo vinila (Figura 7), por meio de uma reação de condensação entre malonil-CoA e 4-coumaroil-CoA, de fórmula química $C_{14}H_{12}O_3$ e massa molar $228,25 \text{ g.mol}^{-1}$, catalisada pela resveratrol-sintase (SÖNMEZ et al, 2007), como resposta da planta ao estresse ambiental ou ao ataque de bactérias não patogênicas, vírus ou fungos (SAIKO et al, 2008). Geralmente, o RVT apresenta-se como uma mistura de seus dois isômeros geométricos *cis* e *trans*, sendo a forma *trans* aquela predominante encontrada, e mais ativa farmacologicamente (FILIP et al, 2003), provavelmente devido a sua conformação planar (MÉRILLON et al, 1997).

Figura 7 - Estrutura química do *trans* e *cis* RVT. A forma *trans* é relativamente estável, sendo a forma estérica predominante na natureza



Desde sua descoberta, a partir da planta Heléboro Branco em 1940 (TAKAOKA, 1940), várias propriedades úteis a preservação da saúde ligadas ao uso do RVT foram relatadas. Entre elas, inibição da atividade antiplaquetária (BERTELLI et al, 1995), atividade anti-inflamatória (BAUR & SICLAIR, 2006; KANG et al, 2009), protetor cardiovascular (DUDLEY et al, 2009), antiviral (DOCHERTY et al, 2005), ação antitumoral (LE CORRE et al, 2004; SHU et al, 2010), além de potente capacidade neuroprotetora (ANEKONDA, 2006). Entretanto, sua característica antioxidante é uma das propriedades biológicas mais destacadas (PANDEY & RIZVI, 2010), embora ainda não seja claro se este é um efeito de eliminação direta ou resultado da ativação de vias que regulam as defesas antioxidantes naturais das células.

Sabe-se entretanto, que a resistência ao estresse oxidativo gerada pelo tratamento com o RVT é fortemente ligado às vias que são ativadas pela mimetização da restrição calórica. Esse processo é considerado uma das formas mais robusta e reprodutível de prolongar a saúde e a longevidade, tendo como principal característica em mamíferos a diminuição da incidência ou início tardio de doenças associadas à idade, incluindo câncer, doenças cardiovasculares e cognitivos, e, um mais lento declínio funcional (BAUR & SINCLAIR, 2006). Uma hipótese atraente é que o resveratrol pode utilizar as mesmas vias ativadas pela restrição calórica em mamíferos, tal como ele parece fazer em outros organismos (HOWITZ et al, 2003). Entre essas vias, pode ser citada a via das proteínas Sirtuinas que estão ligadas à promoção da sobrevivência e a resistência ao estresse nos tempos de adversidades (WOOD et al, 2004).

Além da ação mimética à restrição calórica, o RVT parece promover a inibição da quinona-redutase-2 e sendo assim, pode regular a expressão de antioxidantes celulares e enzimas de desintoxicação (tais como catalase, uma quinona redutase, glutathione-S-transferase) melhorando a resistência celular ao estresse oxidativo (BURYANOVSKYY et al, 2004) e também, pode realizar a modulação do metabolismo lipídico, por meio da inibição da oxidação da LDL, o que está fortemente associado com o risco de doença cardíaca coronária e infarto do miocárdio (FRANKEL, WATERHOUSE, & KINSELLA, 1993; FREMONT; BELGUENDOZ & DELPAL, 1999; HOLVET, 2004).

No SNC, o RVT possui efeitos neuroprotetores agindo em disfunções e desequilíbrios metabólicos que originam as principais doenças progressivas neurodegenerativas, tais como a doença de Alzheimer (KUMAR et al, 2007), de

Huntington (PARKER et al, 2005; KUMAR et al, 2006) e Parkinson (JIN et al, 2008). A partir daí, numerosas estratégias que empregam a abordagem nutricional e/ou farmacológica, podem surgir como forma de proteção do SNC aos danos causados por toxinas e desequilíbrios metabólicos ou de idade (SAIKO et al, 2008). Entretanto, ainda não são totalmente elucidados os meios dessa proteção; sabe-se porém, que suas propriedades tradicionalmente conhecidas, como por exemplo, antioxidante e anti-inflamatória, podem desempenhar papéis importantes no tratamento de doenças no SNC de forma sinérgica, e talvez, seja esse seu principal diferencial entre os fármacos mais bem orientados, que podem não ser capazes de modular os sintomas da doença de forma tão eficaz.

Um grande número de estudos abordam o uso de RVT como possível incremento no tratamento da doença de Parkinson (PD) (ALVIRA et al, 2007; BLANCHET et al, 2008; ZHANG et al, 2010(a); WU et al, 2012), uma das mais comuns doenças degenerativas do sistema nervoso em pacientes de meia-idade ou idosos. Do tipo crônica e progressiva, essa doença é caracterizada patologicamente pela perda e degeneração progressiva de corpos celulares e terminais nervosos dos neurônios dopaminérgicos localizados nos tecidos nigroestriatais, conduzindo assim, à depleção de dopamina no corpo estriado e aparecimento de rigidez, bradicinesia, instabilidade postural e tremor em repouso (ABOU-SLEIMAN, MUQIT & WOOD, 2006; SRIVASTAVA et al, 2012).

Várias causas podem estar ligadas à perda de neurônios dopaminérgicos, como: hereditariedade, fatores ambientais, envelhecimento, alterações imunológicas, danos por radicais livres, sobrecarga de cálcio ou ferro, efeitos excitatórios neurotóxicos, apoptose e anormalidades metabólicas (WANG et al, 2011). Apesar de um grande número de fatores causadores desse mal, o estresse oxidativo é um fator unificador na patogênese da PD, já que o SNC são propensos à ele (KHAN et al, 2010).

O estresse oxidante no cérebro manifesta-se predominantemente como peroxidação lipídica, devido ao seu alto teor de lipídios, alta concentração de ácidos graxos polinsaturados, e baixo teor de glutathione, tornando-se assim, particularmente susceptível à oxidação que pode conduzir à perturbações estruturais e funcionais das membranas celulares, a inativação das enzimas, e, por fim, morte celular (KHAN et al, 2010). Assim, pode-se especular que o tratamento com uma suplementação do

antioxidante RVT pode impulsionar a normalidade do sistema contra o estresse oxidativo.

Outros estudos abordam a utilidade do tratamento com RVT em outras disfunções do SNC. Mazzio, Harris & Soliman (1998) sugeriram uma inibição RVT-induzida da atividade da monoamina oxidase (MAO) em células gliais, podendo resultar na melhora de quadros de comportamento do tipo depressivo e de ansiedade. Xu e colaboradores (2010) também demonstraram efeito positivo contra casos de depressão induzida, após um tratamento agudo com RVT que reduziu significativamente o tempo de imobilidade na natação forçada, o que indica um possível efeito antidepressivo. Sönmez e colaboradores (2007) evidenciaram que o tratamento com uma dose única de 100 mg/kg de RVT, imediatamente após a lesão cerebral traumática, reduziu o estresse oxidativo e volume da lesão em ratos adultos, além de que a avaliação histopatológica demonstrou que o tratamento também diminuiu significativamente a perda de neurônios do hipocampo.

Entretanto, problemas relacionados ao RVT impossibilitam o seu lançamento como um fármaco quimioterápico, antioxidante ou neuroprotetor já que suas potenciais aplicações terapêuticas são dependentes da concentração de RVT que consegue atingir o sítio ativo. A biodisponibilidade oral dessa molécula é muito baixa (WALLE et al, 2004) pelo fato de ser amplamente metabolizado (HU, 2007) tendo uma meia-vida curta de, no máximo, 30 min (BERTELLI et al, 1996). Também, a grande maioria da dose é convertida em sulfatos conjugados, o que parece ser o passo limitante da biodisponibilidade do RVT (WALLE et al, 2004). A baixa solubilidade em água e nos fluídos gastrointestinais (log de P de 3,4) (AMRI et al, 2012), favorece a diminuição da biodisponibilidade do RVT, transformando suas ações terapêuticas e profiláticas em um enorme desafio.

Portanto, o mecanismo pelo qual o RVT exerce os efeitos benéficos, frente aos modelos de doenças, em diferentes espécies, ainda não está elucidada, mas as tentativas de mostrar efeitos favoráveis *in vitro* tiveram um sucesso quase universal, e levaram à identificação de múltiplos alvos para este composto (SAIKO et al, 2008). No entanto, os resultados dos estudos farmacocinéticos indicam que as concentrações circulantes são rapidamente metabolizadas e lançam dúvidas sobre a relevância fisiológica das doses normalmente utilizadas para experimentos *in vitro*, e, por isso, o estudo da melhoria da

farmacocinética e experimentos *in vivo* tornam-se cada vez mais importantes na tentativa de entender como o RVT é eficaz no tratamento de diferentes doenças.

Nesse contexto, as formas farmacêuticas de liberação modificada baseadas na nanotecnologia podem ser alternativas altamente viáveis, uma vez que são capazes de alterar o perfil biológico e aperfeiçoar as características físico-químicas e farmacocinéticas desse ativo. Com a finalidade de proporcionar ao RVT uma melhor solubilidade em meios aquosos, melhor estabilidade e uma possível potencialização em sua ação terapêutica, vários trabalhos já estudaram a possibilidade da formação de complexos entre ciclodextrinas e a esse fármaco (LU et al, 2009; LUCAS-ABELLÁN et al, 2007; ANSARI et al, 2011). Por outro lado, Kristl et al (2009) propuseram a formação de lipossomas carregados com RVT para a melhoria da ação contra os danos oxidativos, e, como eles, outros pesquisadores também propuseram esta técnica para a otimização farmacológica da molécula (NARAYANAN et al, 2009; COIMBRA et al, 2011). Lipoesferas e microesferas poliméricas também já foram propostas por alguns estudos (NAM et al, 2005; FANG et al, 2007; PENG et al, 2010; MENDES et al, 2012).

Entre os desenvolvimentos mais recentes, Zhang e colaboradores (2013) produziram uma nanodispersão de RVT a fim de melhorar a sua estabilidade e produzir melhor velocidade de dissolução. Entre os existentes, poucos estudos propõem a utilização das técnicas de produção de nanopartículas, sistemas esses que apresentam grandes vantagens sobre os outros sistemas citados anteriormente. Kim e colaboradores (2012) produziram nanopartículas pelo método de precipitação anti-solvente à temperatura controlada, com a finalidade de melhorar a solubilidade aquosa do RVT. Zhang e colaboradores (2010(b)) utilizaram da técnica de emulsão-evaporação do solvente. Oganesyanyan et al (2010), melhoraram a biodisponibilidade oral do RVT de 19% para até 61% após sua nanoencapsulação. Frozza et al (2010) preservaram a atividade biológica e melhoraram a sua biodisponibilidade cerebral após administração intraperitoneal e também oral, através da preparação de nanocápsulas de núcleo lipídico carregadas com RVT.

A literatura disponível indica, portanto, que, a junção de um fármaco de amplo espectro farmacológico, com baixa ou nenhuma toxicidade às células saudáveis do organismo, à um meio de condução apropriado, pode permitir uma maior liberação do fármaco nos tecidos desejados, devido à alteração do perfil de distribuição do fármaco. Assim, este trabalho visou desenvolver e caracterizar um sistema nanométrico a partir

do polímero PLA, com ou sem revestimento específico (PEG e P80), visando uma forma de carreamento e direcionamento cerebral do fármaco em questão, além de avaliar os efeitos protetores do RVT-livre e do RVT-carregado em nanopartículas em um modelo experimental da PD induzido por MPTP em camundongos C57BL/6. Suas atividades neuroprotetoras foram avaliadas por monitorização dos seus efeitos sobre os níveis de peroxidação lipídica (TBARS), enzimas tirosina hidroxilase e avaliação comportamental.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

Desenvolver nanopartículas de PLA, PLA-PEG e PLA-P80 contendo RVT, como protótipo de novo medicamento de liberação prolongada visando o direcionamento cerebral, acompanhado da manutenção da ação antioxidante do fármaco, além de investigar o possível efeito terapêutico em um modelo experimental (*in vivo*) de doença de Parkinson.

2.2 Objetivos específicos

- Desenvolver um método analítico por CLAE/PDA para a determinação da eficiência de encapsulação de RVT em nanopartículas poliméricas;
- Produzir nanopartículas poliméricas contendo RVT, utilizando o método de simples emulsão-evaporação do solvente;
- Desenvolver um estudo da influência dos fatores da formulação às características do sistema formado, a partir de um modelo matemático de delineamento fatorial;
- Determinar a eficiência de encapsulação, por meio do método de CLAE/PDA desenvolvido;
- Efetuar a caracterização físico-química das nanopartículas;
- Analisar os perfis de liberação das nanopartículas produzidas;
- Estudar a atividade antioxidante *in vitro* proveniente do fármaco nanoencapsulado;
- Investigar o potencial efeito protetor da formulação de PLA-P80 contendo RVT contra a neurotoxicidade induzida pela administração intranasal de 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP) em camundongos.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Substâncias e reagentes

3.1.1 Fármaco

- *Trans*-Resveratrol (Pharmanostra, Brasil)

3.1.2 Validação do Método Analítico

- Água ultrapura (sistema Milli-Q Gradiente Millipore®, resistividade de 18,2 MΩ/cm)
- Metanol (grau HPLC) (J.T. Baker)

3.1.3 Produção das nanopartículas

- Poli(álcool vinílico) (Sigma Chemical Co., USA)
- Polissorbato 80 (Sigma Aldrich Co)
- Diclorometano (Fmaia)
- Acetato de etila (P.A Biotec®)
- Dimetil sulfóxido (P.A, Biotec®, DMSO)
- Poli(DL-ácido láctico) (Sigma Chemical Co) (85,000 – 160,000 MW)
- Polietilenoglicol (Sigma Chemical Co, USA, 10 KDa)
- D(+) Sacarose P.A. (Vetec Química Fina)

3.1.4 Avaliação dos efeitos neuroprotetores das nanopartículas de PLA-P80 carregadas com RVT em um modelo experimental de Doença de Parkinson

- Cloreto de Sódio (0,9 % P.A.)
- Cloridrato de 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina, MPTP HCl (Sigma Chemical Co., EUA)
- Tampão HEPES 10 mM, pH 7,9

- Tampão de lise gelado (50 mM Tris-HCl pH 7,5, 1% de Triton X-100, 100 mM de NaCl, 5 mM de EDTA pH 8,0, 40 mM β -glicerolfosfato, 50 mM NaF, 200 mM ortovanadato, 5% de glicerol e os inibidores de proteases)
- Tampão Tris (Tris 200 mM, glicerol 10%, SDS a 2%, β -mercaptoetanol 2,75 mM e azul de bromofenol a 0,04%)
- TBS (10 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7,5).
- TBS-Tween-BSA (20 mM Tris base, 140 mM NaCl, 0,05% Tween-20, 2% BSA)
- Isoflurano 0,96% (0,75 CAM;. Abbot Laboratórios do Brasil Ltda, RJ, Brasil)
- Anticorpos primários contra a TH
- Anticorpos secundários específicos conjugados a peroxidase (Santa Cruz Biotechnology, CA, EUA)
- Kit de aumento de quimiluminescência (Luminol Reagent sc-2048, Santa Cruz, CA, USA)

3.1.5 Outros reagentes e solventes

- Brometo de potássio, grau espectroscópico (KBr) (ALDRICH Co., St. Louis, Estados Unidos);
- ABTS (2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolinona-6-ácido sulfônico))
- Fosfato de sódio monobásico anidro P.A. (Vetec®);
- Fosfato de potássio dibásico P.A. (Biotec®);

3.2 Equipamentos e acessórios

- Aparelho para Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) – Waters® Alliance acoplado à um detector de Arranjo de Fotodiodo (PDA) e coluna fase reversa C18 (25cm X 4mm) de tamanho de partícula 5 μ m – Xterra Waters®
- Aparelho de Infravermelho Nicolet IR200 FT-IR (Thermo Scientific, EUA)
- Balança analítica M214A – Tecnal®
- Bomba a vácuo (Tecnal – Mod. TE 058);
- Capela de fluxo laminar - Lucadema
- Centrífuga ct 15000r - Centribio®

- Célula de Franz (Zmag, Mixdrive 6) acoplada a banho ultratermostático
- Dispersor Ultrasônico - Unique®
- Difractômetro de raios X (Bruker – Mod. D2 PHASER).
- Evaporador rotatório - Tecnal® – Mod. TE 120
- Equipamento para medida do espalhamento dinâmico da luz – “Light Scattering” (Brookhaven 90 Plus)
- Equipamento para análise do potencial zeta – ZetaSizer ZS, Malvern
- Filme radiográfico (Amersham Hyperfilm ECL)
- Liofilizador (Terroni – Mod. LD1500);
- Leitor de microplacas (Spectra Max 190 – Molecular Devices);
- Membranas filtrantes (acetato de celulose 0,22 μm e PTFE 0,45 μm) Millipore®
- Membrana de nitrocelulose (Amersham Hybond™-C Extra)
- Osmose reversa laboratorial – Vexer Indústria e Comércio de Equipamentos LTDA;
- Pipetas monocal - Labmate®
- Sistema de filtração por membranas
- Sistema de ultrapurificação de água – MilliQ Gradiente Millipore®
- Ultracentrífuga refrigerada – Cientec CT-15000R

3.3 Procedimento experimental

3.3.1 Desenho experimental

O projeto teve início pelo desenvolvimento de um método analítico por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) com detecção por arranjo de fotodiodo (PDA), com o intuito de se obter uma ferramenta confiável e reprodutível para o processo de caracterização das nanopartículas produzidas por meio da determinação da eficiência de encapsulação (EE%). Linearidade, precisão, exatidão, especificidade, limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) e robustez foram avaliados.

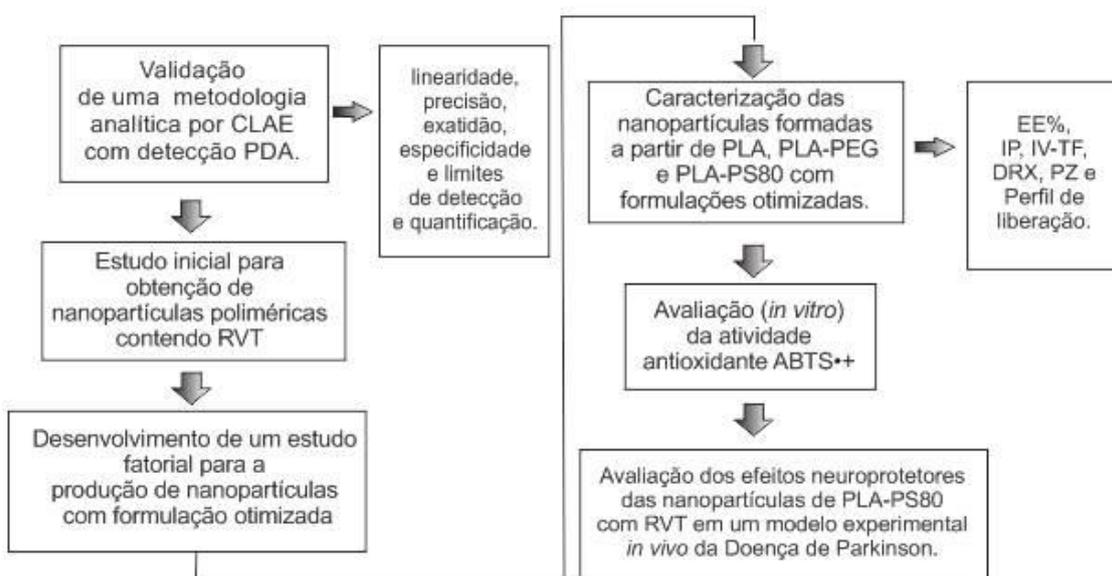
Em seguida, foram obtidas nanopartículas poliméricas de PLA, PLA-PEG e PLA-P80, a partir de uma formulação inicial eleita de forma empírica, segundo a literatura existente. A partir desse estudo inicial, com a finalidade de se obter uma formulação de

nanopartículas otimizada, utilizou-se de uma ferramenta matemática, o estudo fatorial 3x2, para avaliar os efeitos de parâmetros da formulação diante as características da nanopartícula.

Posteriormente, as nanopartículas com a formulação otimizada foram caracterizadas por estudos de EE%, diâmetro médio, índice de polidispersividade (IP), espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FT-IR), difração de raios X (DRX), potencial zeta (PZ) e liberação do fármaco.

O potencial farmacológico do sistema foi analisado por meio da análise *in vitro* da atividade antioxidante do sistema pelo método de descoloração do radical ABTS^{•+} (2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolinona-6-ácido sulfônico)) e *in vivo*, pelo estudo da avaliação do efeito neuroprotetor das nanopartículas de PLA-P80 carregadas com RVT, em um modelo experimental da doença de Parkinson (MPTP).

Figura 8 - Fluxograma ilustrativo das etapas desenvolvidas nesta pesquisa .



3.3.2 Validação do método analítico para a quantificação do RVT presente nas nanopartículas

O desenvolvimento da metodologia analítica por HPLC foi realizado com o objetivo de padronizar um método de quantificação para RVT, que foi posteriormente

utilizado para a análise da eficiência de encapsulação do RVT em cada formulação de nanopartículas poliméricas.

3.3.2.1 Condições cromatográficas

As análises foram desenvolvidas empregando o modo isocrático. A fase móvel foi composta por metanol e água (51:49, v/v) em fluxo de 0,9 mL/min. O volume de injeção foi de 20 µL e a leitura foi realizada em 306 nm. O tempo de corrida foi de 7,5 min e o experimento foi realizado em temperatura de 25°C.

3.3.2.2 Preparação das soluções-padrão, controles de qualidade e amostras

Um padrão estoque de RVT (1 mg/mL) foi preparado em uma mistura de metanol/água (50:50, v/v) e as diluições posteriores foram realizadas para se obter seis soluções-padrão (10, 20, 25, 30, 40 e 50 µg/mL). Similarmente, seis soluções padrão (1, 2, 4, 6, 8 e 10 µg/mL) foram obtidas para determinar o limite de quantificação (LQ) e o limite de detecção (LD). Antes da injeção, os padrões e as amostras foram filtradas através de um filtro de tamanho de poro de 0,22 µm (Millipore®, Bedford, EUA).

3.3.2.3 Validação do método cromatográfico

O método de CLAE foi validado em termos de linearidade, precisão, exatidão, especificidade, robustez, LQ e LD, segundo as normas da *International Conference on Harmonization* (ICH) (2005) e da resolução R.E. 899, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (2003).

A especificidade foi avaliada por comparação dos cromatogramas representativos de amostras contendo possíveis substâncias interferentes (excipientes utilizados na composição de nanopartículas) e amostras contendo somente RVT. Além disso, a especificidade foi demonstrada por meio da realização de estudos de estresse (isto é, estabilidade frente à exposição prolongada a luz, à picos de temperatura e variação de pH).

A linearidade foi determinada com base no cálculo de regressão linear empregando mínimos quadrados, a partir da construção de uma curva analítica (área do

pico *versus* concentração) utilizando-se seis soluções-padrão de RVT em uma mistura de metanol/água (50:50, v/v) em triplicata (10, 20, 25, 30, 40 e 50 µg/mL).

A precisão foi comprovada por dois métodos, intra-corrída (repetibilidade) e inter-corrídas (precisão intermediária). No primeiro, avaliou-se três diferentes controle de qualidade (CQs) (10, 30 e 50 µg/mL) repetidas vezes (10 leituras individuais de cada CQ), no mesmo dia, e em curto espaço de tempo entre as leituras. A precisão intermediária foi observada através da análise dos CQs em triplicata por três dias diferentes. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão (DP) e desvio padrão relativo (DPR).

A exatidão foi determinada calculando a porcentagem de recuperação do RVT (equação 1) a três níveis de concentração e a determinação de seu DPR. O valor da concentração média obtida para cada nível foi comparado com o valor teórico, que foi considerado ser 100%.

$\text{Recuperação} = (\text{concentração média experimental} / \text{concentração teórica}) \times 100$ <p>(Equação 1)</p>

A análise de LQ e o LD foram baseados em uma curva analítica própria obtida a partir da leitura das concentrações em triplicata dos padrões de 1, 2, 4, 6, 8 e 10 µg/mL. Para sua determinação foram utilizados os valores da inclinação da curva (*slope*) e o desvio-padrão do intercepto com eixo y, de acordo com as seguintes equações (eq. 2 e 3):

$LD = 3,3 \times \sigma/S$	Equação 2
$LQ = 10 \times \sigma/S$	Equação 3

Onde: σ é o desvio padrão médio do intercepto com o eixo y e S é a inclinação da curva analítica ou *slope*.

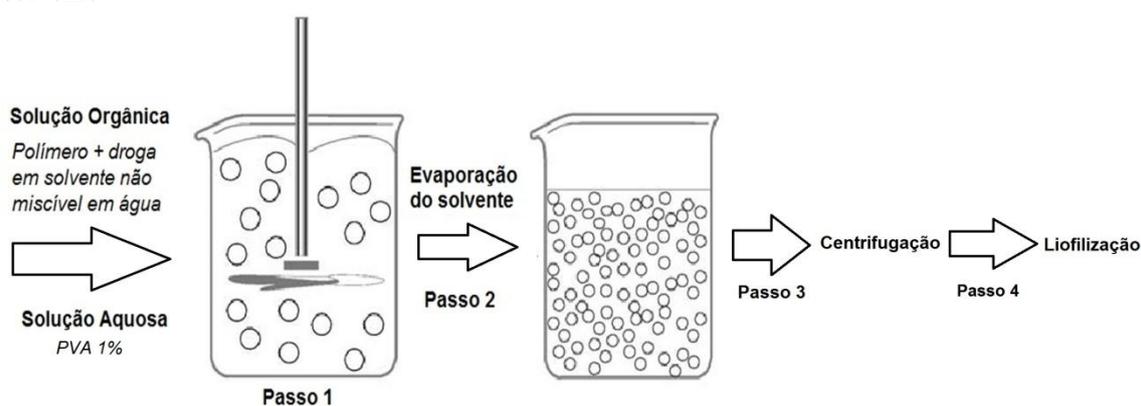
A robustez permitiu a determinação da constância do método à pequenas e deliberadas variações dos parâmetros analíticos. Para isso, variou-se a temperatura do forno da coluna (de 25°C para 30°C e 20°C) e a coluna, a qual foi substituída por uma similar também C₁₈, porém de diferente marca comercial (Vertical®). Os resultados foram expressos em porcentagem de recuperação e DPR.

3.3.3 Preparação dos sistemas nanoparticulados

3.3.3.1 Preparação das nanopartículas de PLA e PLA-PEG contendo resveratrol

A escolha do método de preparação das nanopartículas foi feita com base em uma série de fatores, como o tipo de polímero, área de aplicação do sistema, tamanho de partícula desejado, etc. Neste trabalho, as nanopartículas foram produzidas a partir do método de simples emulsão-evaporação do solvente (Figura 9), descrito inicialmente por Vanderhoff et al, em 1979.

Figura 9 - Representação ilustrativa do método de simples emulsão-evaporação do solvente



(Adaptado de REIS et al, 2006)

Resumidamente, o PLA (50 mg) foi dissolvido em diclorometano (1900 μL), ou diclorometano (1000 μL) e acetato de etila (900 μL), com ou sem PEG (10 mg), à temperatura ambiente, e o RVT (5 mg) dissolvido em DMSO (100 μL) foi adicionado à esta solução que foi rapidamente vertida numa solução aquosa de Poli(álcool vinílico) (PVA - 1 %, p/v, 6 ou 10 mL) e emulsionado por meio de ultra-sons durante 10 minutos (80-100 % de 500 W), o que resultou em uma emulsão óleo em água (O/A). Em seguida, o solvente orgânico foi removido rapidamente por evaporação sob vácuo a 37°C (20 min) e as partículas foram, então, recuperadas por ultracentrifugação (19975 \times g, 30 min, 4°C) e lavadas duas vezes com água para remover o tensoativo. As nanopartículas foram dispersas no crioprotector sacarose a 5 % (p/v, aproximadamente 20 μL), e a nanosuspensão resultante foi subsequentemente arrefecido até -18°C e liofilizadas (Terroni®, Brasil).

Todas as formulações para o delineamento fatorial e caracterização dos sistemas foram produzidas em triplicata. Além das formulações carregadas com o fármaco, nanopartículas controle negativo também foram produzidas (nanopartículas na ausência do fármaco).

3.3.3.2 Preparação de nanopartículas de PLA-P80 contendo resveratrol

As nanopartículas de superfície modificada com P80 receberam o revestimento após a finalização do processo de produção das nanopartículas convencionais, ao contrário do que empregado para as nanopartículas modificadas com PEG.

As nanopartículas de PLA-P80 foram produzidas conforme Gelperina e colaboradores (2002 e 2010), com pequenas modificações. Após a formação e lavagem das nanopartículas convencionais, de acordo com o citado no subitem 3.3.3.1, as nanopartículas foram redispersas em 1 mL de solução de P80 (1 %, v/v) e congeladas depois de meia hora de encubação a temperatura ambiente.

3.3.4 O estudo de delineamento fatorial

Um estudo do tipo fatorial permite produzir um máximo de informações por meio de um mínimo de experimentos e gastos (FANGUEIRO et al, 2012). Por isso, possui grande utilidade na área de produção e tecnologia farmacêutica. Nesta pesquisa, após uma estudo randomizado de pré-formulação e avaliação da literatura disponível, optou-se pela otimização das formulações das nanopartículas de PLA e PLA-PEG carregadas com RVT através de uma análise fatorial do tipo 3x2. Esse trabalho não englobou as nanopartículas de PLA-P80, já que estes sistemas são revestidos apenas após o final do processo de produção de uma nanopartícula convencional. Sendo assim, a influência gerada nas formulações de PLA são também aquelas que fornecem influência nas nanopartículas de PLA-P80.

As variáveis analisadas no estudo estão discriminadas na Tabela 2. Como variáveis independentes, foram selecionadas a concentração de tensoativo (T%), variadas em 1 e 2%, a razão entre as fases aquosa:orgânica (R), que variou de um nível alto de 5:1 e um nível baixo de 3:1, e, a composição do solvente (S), diclorometano (DCM) ou diclorometano e acetato de etila (DCM+AE). A interferência dos

componentes da formulação foi estudada frente a duas características essenciais em uma nanopartícula: o tamanho da partícula gerada e a EE% do sistema (variáveis dependentes).

Tabela 2 - Parâmetros utilizados no estudo de delineamento fatorial

Variáveis independentes	Nível alto	Nível baixo
T% (concentração de tensoativo)	2%	1%
R (razão entre fase aquosa:orgânica)	5:1(mL)	3:1 (mL)
S (composição do solvente)	DCM + AE	DCM
Variáveis dependentes		
EE%		
Diâmetro da partícula		

DCM = diclorometano; AE = acetato de etila

Todos os outros parâmetros (tempo de sonicação, temperatura, pressão, tempo de evaporação, etc.) foram mantidos constantes, de forma a minimizar quaisquer flutuações significativas. A combinação entre as variáveis gerou oito formulações distintas para cada constituição polimérica. Cada formulação foi produzida em triplicata de acordo com a Tabela 3.

Tabela 3 - Diferentes formulações utilizadas para a produção de nanopartículas de PLA e blendas de PLA-PEG, segundo o delineamento fatorial 3x2

Formulação	T%	R	S
F1	1%	5:1	DCM
F2	2%	5:1	DCM
F3	1%	3:1	DCM
F4	2%	3:1	DCM
F5	1%	5:1	DCM+AE
F6	2%	5:1	DCM+AE
F7	1%	3:1	DCM+AE
F8	2%	3:1	DCM+AE

T% = concentração do tensoativo; R = razão entre fase aquosa:orgânica; S = composição do solvente; DCM = diclorometano; DCM+AE = diclorometano + acetato de etila

O protocolo fatorial seguiu o modelo descrito por Banzatto e Kronka (1989), com pequenas modificações. Os dados estatísticos obtidos referentes às variáveis dependentes foram submetidos a uma análise de variância (ANOVA) com

desdobramento dos graus de liberdade, seguido do teste de Tukey, e foram consideradas significativas com $p < 0,05$. Os cálculos do ANOVA foram realizados utilizando o software STATISTICA 7.0 (Statsoft, Inc.) e o teste Tukey foi realizado com o auxílio da equação 4.

$$dms = q \sqrt{\frac{QMR}{n}} \quad (\text{Equação 4})$$

onde: QMR é o quadrado médio do resíduo da análise de variância, n é o número de repetições de cada um dos tratamentos e q é o valor tabelado ao nível de significância estabelecida.

3.3.5 Caracterização físico-química das nanopartículas

3.3.5.1 Análise do diâmetro das nanopartículas

A determinação do diâmetro das partículas e a sua distribuição (Índice de Polidispersão, IP) foram realizadas pela técnica de espectroscopia de correlação de fótons ou *Dynamic Light scattering*.

A fim de se obter o perfil de distribuição de cada formulação produzida, uma alíquota das suspensões de nanopartículas foram diluídas (1:1000, v/v) em água purificada e analisadas com ângulo de espalhamento de 90°, temperatura de 25°C e comprimento de onda 660 nm. Todos os lotes de nanopartículas foram analisados 10 vezes e os resultados expressos como média do diâmetro.

3.3.5.2 Determinação da eficiência de encapsulação

A quantificação de RVT encapsulado nas nanopartículas foi realizada pelo método indireto. Este método determina a concentração de fármaco não-associado ao sistema carreador, após uma análise do sobrenadante resultante do processo de lavagem e ultracentrifugação das formulações.

Uma alíquota do sobrenadante foi diluída (1:100) em metanol e água (50:50, v/v), filtrada em membrana de poro 0,22 µm e analisada por um método de CLAE

(desenvolvido e validado anteriormente, seção 3.2.2.3), a partir da equação da reta da curva analítica de RVT. As análises foram realizadas em triplicata.

A eficiência de encapsulação (EE%) foi determinada a partir da seguinte equação (equação 5):

$$EE\% = (RVT_{\text{inicial}} - RVT_{\text{livre}}) / RVT_{\text{inicial}} \times 100$$

Equação 5

Onde, RVT_{inicial} é corresponde a concentração de RVT adicionada inicialmente à formulação e, RVT_{livre} é a concentração do fármaco não incorporado à partícula quantificado por HPLC. Os valores de EE% foram expressos por média e DP.

3.3.5.3 Potencial zeta

O PZ das dispersões de nanopartículas em água foram determinados por anemometria laser Doppler. As amostras foram acondicionadas em uma célula eletroforética a 25°C, onde um potencial de ± 150 mV foi estabelecido. Os valores potenciais foram calculados como a média e DP dos valores da mobilidade eletroforética, repetidas 12 vezes.

3.3.5.4 Espectroscopia na região do infravermelho

Os espectros obtidos por meio da técnica FT-IR permitem caracterizar polímeros, fármaco e blendas poliméricas, em função da detecção de grupos funcionais, assim como identificar a presença de interações moleculares pela comparação de deslocamentos, variações de intensidade, alargamento ou aparecimento de novas bandas com um espectro característico da amostra (LOPES & FASCIO, 2004).

Para esse ensaio, as amostras foram preparadas em pastilhas de KBr e analisadas na faixa de 250 a 4000 cm^{-1} . Os espectros de nanopartículas de PLA, PLA-PEG e PLA-P80 contendo RVT foram analisados e comparados frente aos espectros obtidos dos polímeros, do fármaco, de uma mistura física entre polímeros e fármaco e das nanopartículas controle negativo.

3.3.5.5 Ensaio de difração de raios X

As medições de DRX foram realizadas utilizando radiação Cu K α em comprimento de onda de 1,54 Å à temperatura ambiente. A tensão e a corrente aplicada foram de 30 kV e 10 mA, respectivamente. As amostras foram acondicionadas em um suporte de amostras de vidro e digitalizados a partir de 5 a 60° em um ângulo de 2 θ .

3.3.5.6 Estudo de liberação *in vitro*

As formulações de nanopartículas de PLA, PLA-PEG e PLA-P80 contendo RVT foram submetidas ao teste de liberação *in vitro*. O ensaio foi realizado em células de difusão de Franz (Hanson Research). O meio receptor foi composto por 7,0 mL de solução salina de tampão fosfato (PBS, 50 mM, pH 7,4) adicionado de 1 % de PVA para se assegurar as condições “sink” no meio. O meio receptor previamente degaseificado foi adicionado a câmara receptora e mantido sob agitação com auxílio de uma barra magnética a 400 rpm e na temperatura $37 \pm 0,5$ °C, utilizando um banho de circulação de água. Entre as câmaras doadoras e receptoras foi utilizado uma membrana de acetato de celulose com valor de corte de poros de 0,22 μ m (UNIFIL). Sobre a membrana foi colocada volumes específicos de nanopartículas que continham quantidades conhecidas de RVT (aproximadamente 200 μ g de RVT). Alíquotas de 500 μ l foram coletadas em tempos pré-determinados e substituídos com um volume igual de meio de dissolução a fim de se manter um volume constante na célula. A análise de liberação foi realizada em duplicata.

A liberação acumulada de RVT (%) foi calculada pela determinação da quantidade de fármaco no meio receptor determinado pelo método de HPLC – PDA (LINDNER, KHALIL & MAINARDES, 2013). A tempo de liberação de 50% (t50%) foi determinado matematicamente a partir da equação da linha de regressão.

A fim de se obter informação sobre o mecanismo de liberação de RVT a partir das nanopartículas, os dados de liberação foram analisados de acordo com os modelos matemáticos de ordem zero, primeira ordem e Higuchi, além do expoente n de liberação segundo o modelo Peppas (RITGER & PEPPAS, 1987). As expressões matemáticas que descrevem os modelos utilizados encontram-se resumidos na Tabela 2.

Tabela 4 - Equações matemáticas para os modelos utilizados para descrever as características de liberação de nanopartículas PLA, PLA-PEG e PLA-P80 carregados com RVT

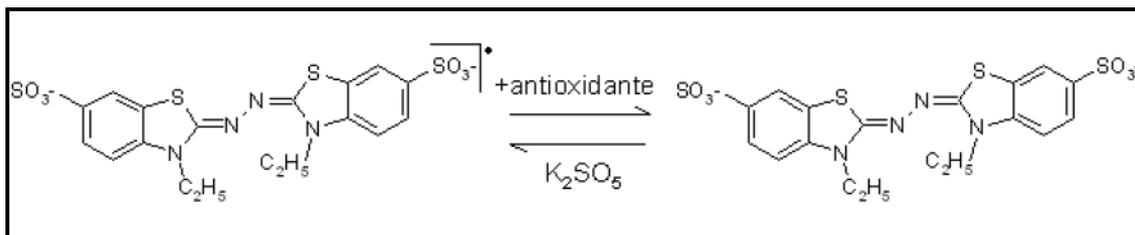
Modelo	Equação	Parâmetros de definição
Zero Ordem	$Q_t = Q_0 + K_0 t$	Q_t representa a quantidade absoluta de fármaco liberada no tempo t e Q_0 a quantidade total de fármaco no tempo 0.
Primeira Ordem	$\ln Q_t = \ln Q_0 + K_1 t$	K_0 = constante de ordem zero
Higuchi	$Q_t = k_H \sqrt{t}$	K_1 = constante de primeira ordem K_H = constante de Higuchi
Korsmeyer-Peppas	$M_t/M_\infty = a t^n$	M_t = é a quantidade de fármaco liberado em um tempo t . M_∞ = é a quantidade do princípio ativo liberado em um tempo infinito. a = constante que incorpora as características estruturais e geométricas da forma farmacêutica; n = expoente de liberação que é indicativo do mecanismo de liberação.

3.3.6 Aplicabilidade das nanopartículas

3.3.6.1 Avaliação *in vitro* da atividade antioxidante das nanopartículas de RVT

O rastreamento da atividade antioxidante foi analisado por meio do estudo de descoloração do radical de 2,29-azinobis-(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico - ABTS) descrito por Re e colaboradores (1999). Este método baseia-se na formação de um radical ($ABTS^{\bullet+}$) gerado por oxidação do ABTS na presença de persulfato de potássio (Figura 10). Sendo a atividade antioxidante determinada pelo grau de descoloração analisada pela absorção do cátion radical em 734 nm (RE et al, 1999).

Figura 10 - Estabilização do radical $ABTS^{\bullet+}$ por um antioxidante (coloração verde-claro) e sua formação com persulfato de potássio (coloração verde-escuro)



Para isso, uma mistura aquosa de ABTS (7 mM) e persulfato de potássio (2,45 mM) foi incubada à temperatura ambiente e com ausência de luz por 12 h para a formação do radical. No momento do uso, o produto resultante foi diluído em tampão fosfato 50 mM (pH 7,4) até obter absorvância próxima à 0,70 em 734 nm.

Diferentes concentrações de RVT (livre ou nanoencapsulado) (1 - 25 μ M) e também amostras de nanopartículas controle negativo foram utilizadas. O $\text{ABTS}^{\bullet+}$ foi incubado com as amostras, nos tempos de 0, 24, 48 e 72 h.

A complexação entre o $\text{ABTS}^{\bullet+}$ e amostras foi medida pelo decréscimo da absorvância após 30 min de incubação, em um leitor de microplacas. Todas as leituras foram realizadas em triplicata e a atividade antioxidante foi calculada como porcentagem de inibição do $\text{ABTS}^{\bullet+}$, de acordo com a equação 6.

$$\text{Inibição} = \left| \frac{(Ac - Aa)}{Ac} \right|$$

Equação 6.

Onde: Ac é a absorvância do controle e Aa é a absorvância da amostra.

Para o estudo relacionado ao IC_{50} (concentração que apresenta 50% da capacidade sequestrante total do radical $\text{ABTS}^{\bullet+}$), as análises estatísticas foram realizadas utilizando o software STATISTICA 7.0 (Statsoft, Inc.). A avaliação por ANOVA de via única foi realizada, seguido da análise de regressão e do teste de Tukey.

3.3.6.2 Avaliação dos efeitos comportamentais e neuroprotetores das nanopartículas de PLA-P80 carregadas com RVT em um modelo experimental *in vivo* da Doença de Parkinson

Os testes realizados a partir deste ponto do estudo foram conduzidos somente com as nanopartículas de PLA-P80, pois tiveram como objetivo uma análise do efeito produzido pelo recobrimento das partículas com P80 sobre o direcionamento cerebral e, com isso, uma ação melhorada do RVT sobre distúrbios ligados ao SNC.

3.3.6.2.1 Animais

Todos os procedimentos relacionados aos animais foram realizados no Laboratório de Bioquímica do Departamento de Biologia da UFSC. Os animais utilizados no estudo foram camundongos machos C57BL/6, pesando entre 20-30 g no início do experimento, com 3 - 4 meses de vida. Os camundongos foram alojados em grupos de 5-7 animais em gaiolas com acesso livre a alimento e água, sob temperatura controlada ($21 \pm 2^\circ\text{C}$) e umidade (60-80%), e um ciclo de 12 h claro/escuro (luzes acesas 07:00). Para o teste de reconhecimento social, foram utilizados também, camundongos machos C57BL/6 com aproximadamente 1 mês de idade e peso corporal variando entre 10 - 20 g.

Todos os animais foram submetidos a um período de adaptação às condições laboratoriais durante, no mínimo, uma semana antes do início dos procedimentos e todos os esforços foram feitos para minimizar o número de animais utilizados e seu sofrimento. Além disso, todos os experimentos foram realizados em conformidade com as orientações de cuidado com os animais do Comitê de Ética no Uso de Animais da UFSC, sob o protocolo número PP00547/CEUA 23080.037850/2010-04/UFSC.

3.3.6.2.2 Administração das nanopartículas de PLA-P80 com RVT pela via intraperitoneal

Os animais foram tratados com as nanopartículas PLA-P80 carregadas com RVT na concentração 20 mg/kg, dispersas em solução salina 0,9% e injetada intraperitonealmente (i.p.) em um volume de 10 mL/kg de peso corporal. Os animais do grupo controle foram tratados pela mesma via de administração, volume e tempo com solução salina utilizada como veículo.

3.3.6.2.3 Administração intranasal do MPTP

Quando atinge o cérebro, o MPTP é convertido no íon tóxico 1-metil-4-fenilpiperidínio (MPP⁺) pela enzima MAO-B, principalmente nas células gliais. O MPP⁺ é uma molécula polar que não atravessa membranas biológicas livremente, porém, possui uma ligação de elevada afinidade com o transportador de dopamina (DAT), sendo assim, capturado em terminais dopaminérgicos. Os neurônios dopaminérgicos acumulam o MPP⁺ que apresenta como mecanismos principais de toxicidade a inibição do complexo I da cadeia de transporte de elétrons. Esse bloqueio faz com que ocorra uma depleção dos níveis de ATP e aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), particularmente o ânion superóxido, que, embora não seja diretamente responsável pela morte neuronal, age como um ativador de várias cascatas celulares que levam a morte de neurônios dopaminérgicos (PREDIGER et al, 2011).

O MPTP HCl, foi administrado pela via intranasal (i.n.) de acordo com o procedimento descrito por Dluzen e Kefalas (1996) e modificado por Prediger (PREDIGER et al, 2006(a); 2009). Resumidamente, após os animais serem anestesiados com isoflurano 0,96%, o MPTP dissolvido em 0,9% de NaCl (10 µL, no tempo de 40 segundos) e administrado (1 mg/narina com intervalo de 24 horas por infusão) com o auxílio de uma micro-seringa de 50 µL (Hamilton, USA) ligada a um tubo apropriado de 7 mm de PE-10, inserido cerca de 10 mm através das narinas.

Os grupos controle receberam pela via i.n. solução salina 0,9% utilizada como controle.

3.3.6.2.4 Desenho experimental

Para o protocolo experimental foram utilizados 41 animais divididos de forma randômica em 6 grupos contendo 5-7 animais conforme a tabela abaixo (Tabela 4):

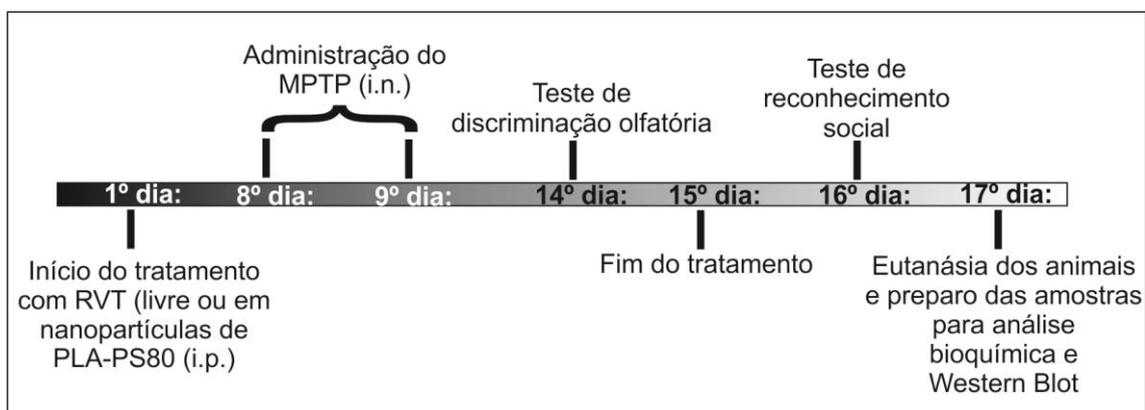
Tabela 5 - Divisão de grupos utilizados para o experimento de avaliação dos efeitos comportais e neuroprotetores das nanopartículas de PLA-P80 contendo RVT em um modelo experimental da Doença de Parkinson

Grupo	Tratamento
1	Controle: Salina (i.p.) / Salina (i.n)
2	RVT livre (20 mg/kg) (i.p.) / Salina (i.n)
3	Nanopartículas de PLA-P80_RVT (20 mg/kg) (i.p.) / Salina (i.n)
4	Salina (i.p.) / MPTP (i.n)
5	RVT livre (20 mg/kg) (i.p.) / MPTP (i.n)
6	Nanopartículas PLA-P80_RVT (20 mg/kg) (i.p.) / MPTP (i.n)

Conforme resumido na Figura 11, as dispersões de nanopartículas contendo RVT, RVT livre ou o veículo foram administrados durante 15 dias consecutivos uma vez ao dia. No oitavo e nono dias após o início dos tratamentos, os animais receberam o MPTP i.n. ou o veículo (como controle).

Os testes comportamentais foram realizados a partir do décimo quarto dia, quando os animais passaram pela análise de discriminação olfatória. Um segundo teste comportamental, a análise de reconhecimento social, foi efetuado após o fim do período de tratamento. No décimo sétimo dia após o início do experimento, os animais foram eutanasiados e as amostras de tecidos preparadas para testes de Western Blot e dosagem bioquímica.

Figura 11 – Desenho experimental dos procedimentos realizados e testes comportamentais avaliados no modelo experimental de Doença de Parkinson em camundongos, por meio da administração intranasal de MPTP



3.3.6.2.5 Análises Comportamentais – discriminação olfatória e reconhecimento Social

Fundamentado no fato de que os roedores geralmente possuem preferência por locais impregnados com o seu próprio odor, ou seja, compartimentos familiares, à lugares com odores não familiares, realizou-se o teste de capacidade de discriminação olfatória aos camundongos a partir de um protocolo previamente avaliado pelo grupo de Prediger et al, 2006(a), 2006(b)). Esse teste foi realizado 5 dias após a administração de MPTP e, resumidamente, cada camundongo foi alocado durante 5 min numa gaiola dividida em duas áreas iguais separadas por uma porta aberta, onde se pode escolher entre um compartimento com serragem nova (compartimento não familiar) e outro com a serragem da caixa de moradia (compartimento familiar), a mesma que ele ocupava nos 3 dias anteriores ao exame.

O desempenho foi acompanhado por um sistema de vídeo-monitoramento (ViewPoint, Life Sciences, Montreal, Canadá) e o parâmetro de tempo (s) de permanência em cada compartimento (familiar versus não-familiar) foi registrado.

A memória social de curto prazo foi avaliada conforme descrito por Dantzer et al (1987) com pequenas modificações (PREDIGER & TAKAHASHI, 2003, 2005;. PREDIGER et al, 2004, PREDIGER, BATISTA & TAKAHASHI, 2005). O teste de reconhecimento social consistiu em duas apresentações sucessivas de 5 min de duração cada, separados por 30 min. Os camundongos adultos foram alojados individualmente em gaiolas plásticas (42×34×17cm) e testados apenas após 24 h de habituação ao seu novo ambiente. O ensaio foi realizado pelo mesmo examinador em uma sala de observação, e todos os camundongos juvenis foram isolados em gaiolas individuais durante 20 min antes do início do teste.

Durante o tempo de apresentação, um camundongo jovem foi alocado dentro da gaiola do camundongo adulto e o tempo gasto pelo adulto para investigar o jovem, cheirando ou arranhando, foi registrada. No final da primeira apresentação, o juvenil foi removido e mantido numa gaiola individual durante o período de 30 minutos e após re-expostos ao camundongo adulto sendo novamente analisado o tempo de investigação por parte do animal adulto.

3.3.6.2.6 Medida da peroxidação lipídica

A eutanásia dos animais foi realizada pelo método de decapitação. Seus cérebros foram removidos, lavados com solução salina gelada (NaCl, 0,9 %, 4°C) e, imediatamente após, dissecados rapidamente sobre gelo.

O estriado foi isolado e homogeneizado em tampão HEPES 20 mM, pH 7,0 gelado (1:10 p/v), posteriormente foram centrifugados a 16.000 x g, por 20 min (4°C). O sobrenadante foi coletado e armazenado em freezer a -80° C para a realização da determinação dos níveis de peroxidação lipídica por meio do teste de quantificação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS).

Os níveis de TBARS nas amostras foram determinados de acordo com Ohkawa e colaboradores (1979). Nesse método, o malondialdeído, um produto final de peroxidação lipídica, reage com o ácido tiobarbitúrico para formar um complexo colorido. Resumidamente, as amostras processadas a partir de tecidos provenientes do estriado foram incubadas a 100°C durante 60 min em um meio de reação ácido contendo dodecil sulfato de sódio a 0,81% e 0,67% de ácido tiobarbitúrico. Após incubação, os níveis de TBARS foram mensurados em 532 nm e comparados a uma curva padrão de malondialdeído (MDA). Os resultados foram expressos como nmol MDA/mg de proteína.

3.3.6.2.7 Eletroforese seguida de imunodeteção da proteína tirosina hidroxilase (*Western Blot*)

O ensaio para imunodeteção de proteínas (*Western blot*) foi realizado para verificar as possíveis alterações nos níveis da tirosina hidroxilase (TH) após o tratamento.

Os tecidos provenientes do estriado dos animais foram homogeneizados (1:10 p/v) em tampão de lise gelado. Os homogenatos foram centrifugados a 13,000 x g, a 4°C durante 45 min. Antes da análise *Western blot*, quantidades equivalentes de proteínas padrão foram misturadas em tampão Tris, fervidas durante 5 min, e mantido a -20 °C até a análise.

Uma alíquota da fração citosólica foi submetida à eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida SDS (PAGE) (12 %) e transferida para uma membrana de

nitrocelulose a 150 V, por 90 min. A membrana foi bloqueada em solução de leite desnatado (5 %) em TBS (pH 7,5) durante 1 hora. Os blots foram incubados com anticorpos primários contra a TH em tampão TBS-Tween-BSA. Após a lavagem da membrana foi adicionado o anticorpo secundário específico conjugado a peroxidase (Santa Cruz Biotechnology, CA, EUA) em tampão TBS-Tween. As bandas imunorreativas formadas foram visualizadas por meio do uso de kit de aumento de quimiluminescência e filme radiográfico, segundo recomendações do fabricante. A Intensidade da banda foi quantificada utilizando o software Scion Image (Scion Corporation, Frederick, MD, EUA). Os valores densitométricos das bandas de TH foram normalizados em relação a bandas de β -actina.

3.3.6.2.8 Determinação das proteínas

As proteínas foram determinada pelo método de Lowry (1951) utilizando a albumina para curva padrão.

3.3.6.2.9 Análise estatística

A avaliação estatística foi iniciada com uma análise segundo o teste de Grubbs, para determinar a existência de valores extremos significantes ao restante do grupo (*outlier*) entre as replicatas. Diferenças entre grupos foram avaliadas através da análise de variância (ANOVA) de duas vias, seguidas pelo teste de comparações múltiplas de Duncan com o software STATISTICA 7.0 (Stafsoft, Inc.).

No teste de discriminação olfatória, o teste t de *Student* pareado foi utilizado para a determinação da mudança de desempenho no teste de cada animal, avaliada pela comparação do tempo que o animal permaneceu na maravalha familiar comparado com o tempo na maravalha nova. Os dados foram representados como média \pm E.P.M e as diferenças foram consideradas significativas quando $P \leq 0,05$.

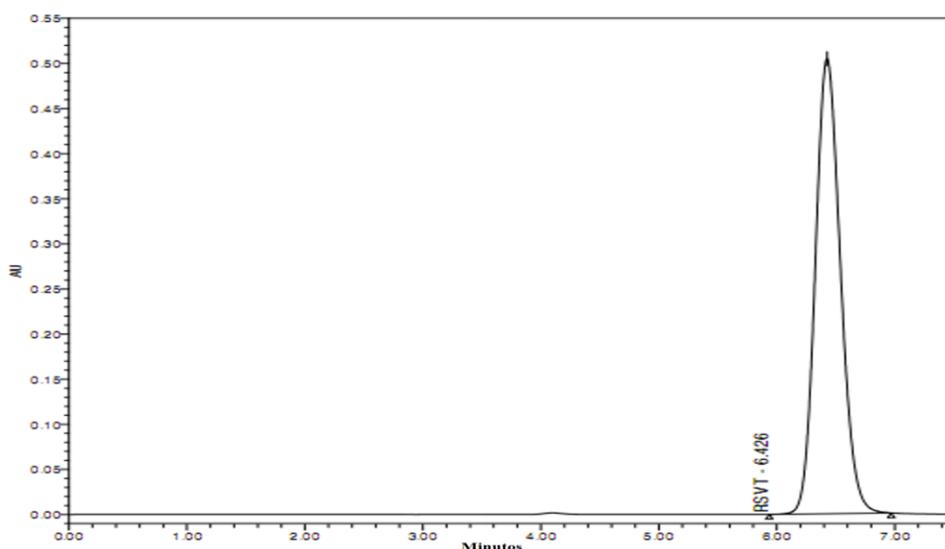
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Validação do método analítico para quantificação do RVT nas nanopartículas

4.1.1 Desenvolvimento do método cromatográfico

Testes iniciais foram realizados utilizando-se como fase móvel misturas de metanol e acetonitrila, com base em métodos existentes para a quantificação RVT no plasma (HE et al, 2006). Várias proporções no modo isocrático foram testadas. Algumas levaram à presença de mais de um pico (metanol / acetonitrila 3:1 e 1,5:1). Depois, água e ácido acético foram introduzidos (RABESIAKA et al, 2011; RODRÍGUEZ-DELGADO et al, 2002). Alguns picos simétricos foram obtidos com metanol, acetonitrila, água e ácido acético, mas em nenhum dos casos, o método demonstrou repetibilidade ou precisão. Quando a acetonitrila e o ácido acético foram removidos e manteve-se somente os solventes metanol e água, foram observados, finalmente, picos mais simétricos. O melhor pico, em termos de largura e simetria, foi obtido com uma fase móvel composta por água e metanol, na proporção de 49:51 (v/v) a um fluxo de 0,9 mL/min. O pico foi detectado em 6,4 min (Figura 12).

Figura 12 - Cromatograma representativo (absorvância (AU) em função do tempo (min)) de RVT (30 µg/ mL) em metanol: água. Fase móvel metanol: água (51:49), fluxo de 0,9 mL/min; detecção no comprimento de onda de 306 nm, temperatura da coluna de 25°C, volume de injeção de 20 µL



4.1.2 Validação do método

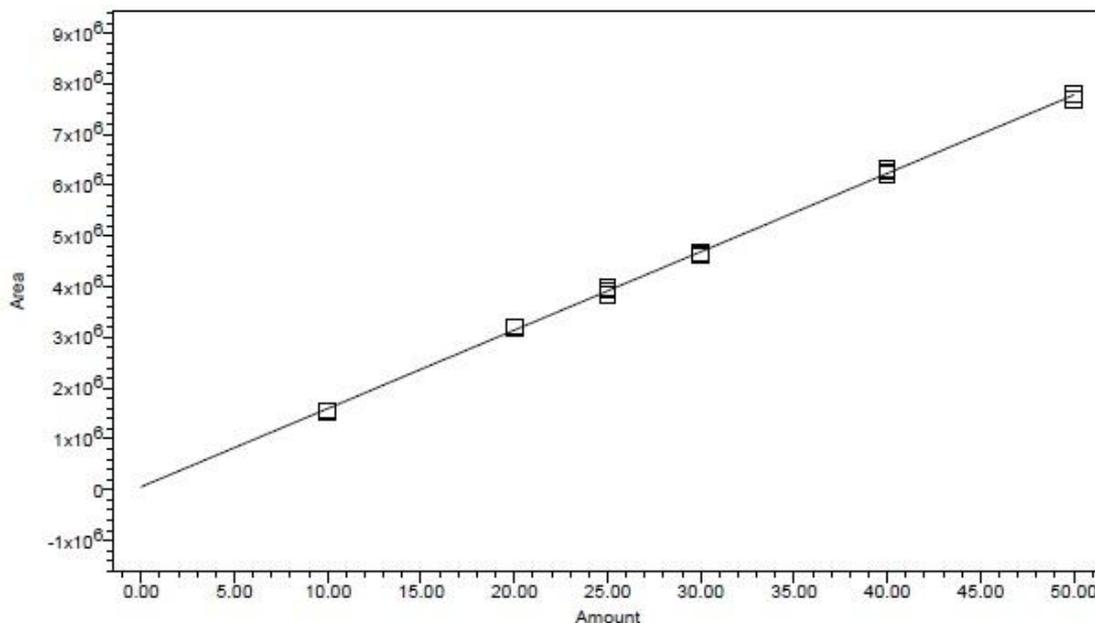
4.1.2.1 Linearidade

A linearidade foi avaliada em seis níveis de concentração (10 a 50 µg/mL, Figura 13), por meio do cálculo da equação de regressão e do coeficiente de correlação (r), pelo método dos mínimos quadrados. Esta análise gerou um $r = 0,999$ e a equação dada por:

$$Y = 1.54 \times 10^5 C + 5.36 \times 10^4 \quad \text{Equação 7.}$$

onde Y é a área do pico e C é a concentração da solução padrão em µg/mL. O valor de r próximo de 1 indica linearidade no intervalo proposto. A validade do teste foi confirmada por uma análise de variância, que mostrou que a regressão linear foi significativa e o desvio da linearidade não foi significativo ($p < 0,01$).

Figura 13 - Curva analítica do RVT em metanol:água (50:50, v/v). Fase móvel metanol-água (51:49) em 306 nm (n=3)



4.1.2.2 Exatidão

A exatidão foi verificada como porcentagem de recuperação e DPR da concentração média do analito em três diferentes concentrações. Soluções de controle de qualidade de 10, 30 e 50 mg/mL foram preparadas cuidadosamente e analisadas com o método proposto. Os resultados detalhados estão apresentados na Tabela 5. A porcentagem média de recuperação de RVT para as amostras foi de 99,30% (DPR = 2,43%, n = 9). Esses dados demonstram a concordância entre os valores experimentais e os teóricos (ICH, 2005).

Tabela 6 – Porcentagem de recuperação e DPR obtida a partir da análise de exatidão

Solução Padrão ($\mu\text{g/mL}$)	Recuperação (%)	DPR (%)
10 (n=3)	96,49	0,090
30 (n=3)	100,692	1,250
50 (n=3)	100,728	0,090

4.1.2.3 Precisão

A precisão é uma medida do erro relativo do método, expressa como DPR, em termos de repetibilidade e precisão intermediária. Três concentrações de RVT (10, 30 e 50 $\mu\text{g/mL}$) foram preparadas e analisadas em triplicata em um dia ou três dias diferentes, com a finalidade de avaliar a variação intra-dia e inter-dia, respectivamente. Os desvios padrão das respostas foram calculados em cada caso, e estão mostrados na Tabela 6 os quais confirmaram que a precisão foi obtida, uma vez que o valor máximo de DPR foi de 1,51%.

Tabela 7 - Ensaio de precisão para a análise do RVT

Solução padrão ($\mu\text{g/mL}$)	Concentração quantificada \pm DP ($\mu\text{g/mL}$)	DPR (%)
Análise de repetibilidade (n=10)		
10	10,082 \pm 0,031	0,316
30	30,606 \pm 0,050	0,165
50	49,803 \pm 0,061	0,122
Precisão Intermediária (n=3)		
Dia 1		
10	9,649 \pm 0,041	0,430
30	30,207 \pm 0,377	1,250
50	50,364 \pm 0,045	0,090
Dia 2		
10	10,035 \pm 0,017	0,173
30	30,624 \pm 0,107	0,351
50	49,872 \pm 0,143	0,286
Dia 3		
10	9,533 \pm 0,143	1,507
30	29,822 \pm 0,110	0,371
50	50,151 \pm 0,092	0,184

4.1.2.4 Robustez

A robustez é uma medida da influência de pequenas alterações nos processos/parâmetros de análise sobre a resposta. A robustez foi avaliada com base no percentual de recuperação e nos valores de DPR obtidos utilizando diferentes parâmetros de temperatura da coluna e marca comercial (Tabela 7). O método é robusto no que diz respeito a estas alterações nos parâmetros cromatográficos. O DPR máximo obtido foi de 2,27%.

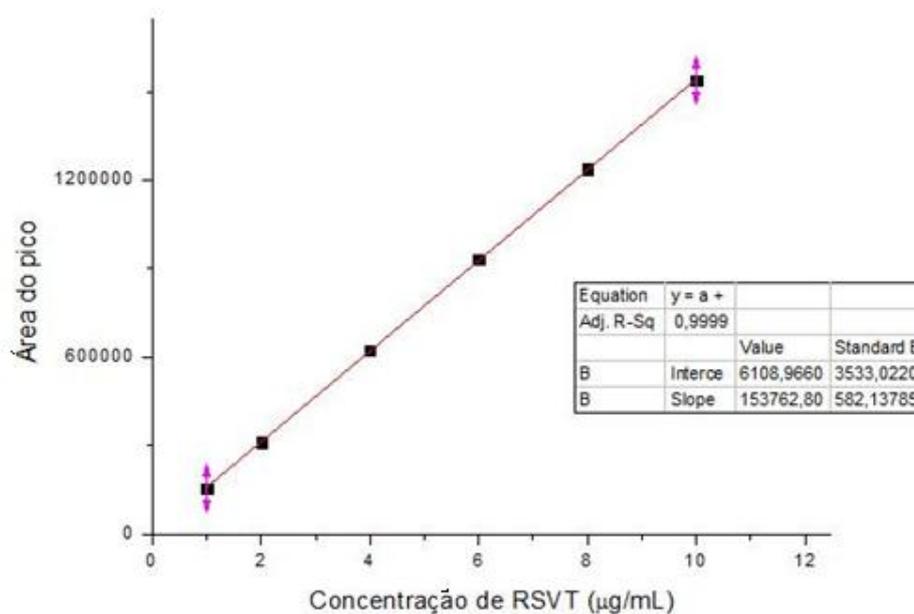
Tabela 8 - Porcentagem de recuperação e DPR obtido nas análises de robustez após modificações na temperatura original do método (25°C) e coluna (n=3)

Modificações do método original	Porcentagem de recuperação ± DPR			
	10 µg/mL	30 µg/mL	50 µg/mL	Média
Temperatura 30 °C	101.053 ± 0,741	101.435 ± 1,007	101.319 ± 0,926	101,269 ± 0,195
Temperatura 20 °C	99.364 ± 0,450	100.584 ± 0,412	99.643 ± 0,252	99,864 ± 0,105
Coluna similar	102,860 ± 1,994	103,514 ± 2,442	102,462 ± 1,720	102,945 ± 0,531

4.1.2.5 Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)

O LQ representa a menor quantidade de analito presente em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas, já o LD é a menor quantidade de analito presente em uma amostra que pode ser detectada, porém não necessariamente quantificada (ANVISA, 2003; ICH, 2005). No presente estudo, esses parâmetros foram calculados a partir do desvio padrão de resposta e o *slope* obtido a partir da regressão linear de uma curva de calibração específica (1-10 µg/mL, Figura 14) na região de baixas concentrações do intervalo previsto (ICH, 2005). O método foi linear neste intervalo, pois o valor de *r* foi 0,999. O LD e LQ obtidos foram 68,0 e 229,0 ng/mL, respectivamente.

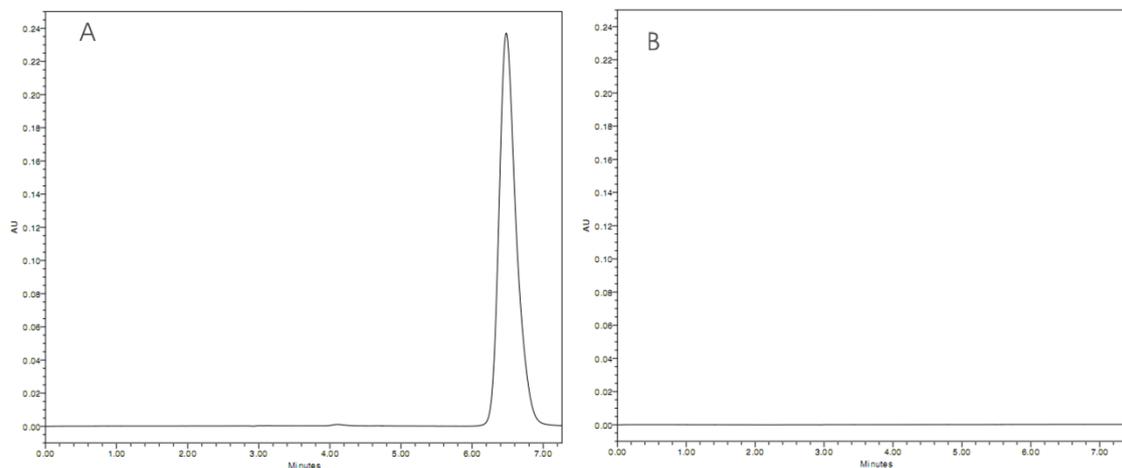
Figura 14 - Curva analítica para o LD e LQ (área do pico vs. concentração de RVT). O slope da curva (S), o desvio padrão do intercepto em y (σ) e o coeficiente de determinação (R^2) são relatados (n = 3)



4.1.2.6 Especificidade

A especificidade do método foi avaliada por comparação dos cromatogramas de padrões e amostras de RVT frente a potenciais componentes interferentes da formulação das nanopartículas. Para esse efeito, as nanopartículas controle negativo (nanopartículas não carregadas com o RVT) foram preparadas como descrito na seção 3.3.3 e o sobrenadante obtido após centrifugação foi diluído em uma mistura metanol:água (50:50, v/v) e analisadas pelo método de CLAE descrito. O cromatograma da amostra representativa de RVT (Figura 15A) mostrou um pico de RVT em aproximadamente 6,4 min, o que estava de acordo com o obtido para o padrão RVT (Figura 12). Não foram encontrados picos neste mesmo tempo de retenção no cromatograma do sobrenadante obtido a partir das nanopartículas controle negativo (Figura 15B), o que indica que não houve interferência na determinação quantitativa de RVT a partir dos componentes da formulação.

Figura 15 - Comparação dos cromatogramas de amostras de RVT frente a potenciais interferentes, componentes da formulação das nanopartículas. Em A observa-se o cromatograma de uma amostra de RVT proveniente do sobrenadante de nanopartículas. Em B, análise do cromatograma do sobrenadante obtido a partir das nanopartículas em branco

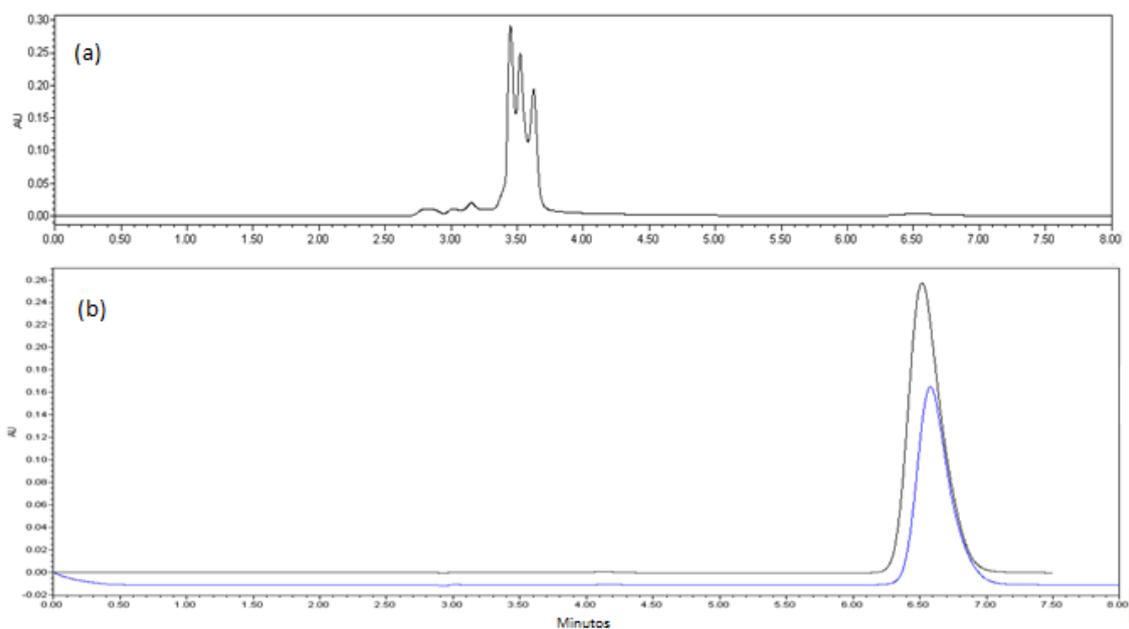


Os testes foram também realizados em condições de estresse (isto é, frente a picos de temperatura, à exposição prolongada à luz visível e à variação de pH) para detectar a ocorrência de eventuais picos de interferência em 306 nm, resultantes da degradação de RVT. Os resultados estão apresentados na Tabela 8 e não mostraram alterações no tempo de retenção RVT, quando a amostra foi exposta à temperatura, à luz visível e ao meio ácido. Na Figura 16, no entanto, foi observada uma diminuição na recuperação RVT causada pela fotodegradação (figura 16 (b)) e a degradação da amostra que impossibilitou a análise do pico de RVT após a exposição às condições alcalinas (figura 16 (a)). Este método pode ser considerado como potencialmente específico, pois não se observou espectros de interferência no tempo de retenção do RVT.

Tabela 9 - Resultados obtidos após a exposição das soluções padrão de RVT à condições de estresse

Condições	Concentração antes do tratamento	Concentração após o tratamento	Porcentagem de recuperação (%)
Luz UV (n=3)	28,218 ± 0,553	21,096 ± 2,066	74,761
Congelamento (n=3)	28,865 ± 0,189	29,602 ± 0,270	102,553
Baixo pH (n=3)	29,758 ± 0,114	29,869 ± 0,033	100,372
Alto pH (n=3)	-	-	-

Figura 16 - Cromatogramas obtidos após a análise de amostras de RVT (30 µg) submetidas a condições de estresse. Em (a) pode-se observar o cromatograma da amostra exposta às condições alcalinas e, em (b), a comparação entre os cromatogramas resultantes da análise antes e depois da exposição à luz visível



4.2 Preparação de sistemas nanoparticulados contendo RVT

A utilização do método de produção de nanopartículas a partir de polímeros pré-formados foi escolhido por propiciar maior segurança, reprodutibilidade e maior facilidade de transposição em larga escala (COUVREUR et al, 2002). Além disso, a técnica de emulsão-evaporação do solvente foi uma das primeiras técnicas desenvolvidas e, atualmente, um dos procedimentos mais empregados na obtenção de nanopartículas.

As nanopartículas de PLA e PLA-PEG e PLA-P80 foram obtidas com sucesso pelo método de emulsão simples (O/A) e evaporação do solvente orgânico, uma vez que resultaram em lotes com capacidade de encapsulação e diâmetro de partícula satisfatórios além de não oferecer dificuldades para a sua produção.

Após a liofilização, o pó resultante apresentou um aspecto macroscópico pulverulento de cor branca.

4.3 Delineamento fatorial

A aplicação de planos de experimentação é frequentemente utilizado para a otimização de formulações farmacêuticas. Estudos com base nos fatoriais permitem que vários fatores sejam variados simultaneamente, possibilitando assim, a avaliação dos efeitos de cada variável em diferentes níveis e a demonstração da inter-relação entre eles (BHAVSAR et al, 2006). Assim, a realização de um delineamento fatorial 3x2 permitiu a determinação da influência do tipo de solvente, DCM e DCM+AE, da razão entre fase aquosa:fase orgânica de 5:1 e 3:1 (R5:1 e R3:1) e da concentração do tensoativo PVA de 1 e 2% (P1% e P2%) sobre o tamanho da partícula e a EE% do fármaco das nanoesferas.

4.3.1 Análise do diâmetro das nanopartículas de PLA e PLA-PEG

O tamanho e o IP estão entre as principais formas de caracterização das nanopartículas, além de ser úteis também em estudos de estabilidade. Mesmo sendo possível utilizar somente suspensões líquidas, a técnica de correlação de fótons, também conhecida como *Dynamic Light Scattering* é amplamente utilizada para essas

determinações, por se tratar de uma técnica não invasiva (WU, ZHANG & WATANABE, 2011). Os valores do diâmetro das nanopartículas podem variar de 10 a 1000 nanômetros (QUINTANAR-GUERRERO et al, 1998), entretanto alguns autores citam que as nanopartículas produzidas com a finalidade de carreamento de fármacos devem possuir diâmetros menores que 300 nm (GUPTA & KOMPELLA, 2006). Os valores de IP podem variar entre 0 e 1, sendo que, valores próximos a 0 indicam homogeneidade da dispersão e valores maiores ou próximos a 0,5 indicam uma alta heterogeneidade nos diâmetro das partículas (AVADI et al, 2010).

Os resultados de diâmetro médio e IP das nanoesferas de PLA e blendas de PLA-PEG produzidas a partir das oito formulações de cada composição polimérica do esquema fatorial encontram-se na Tabela 10.

Tabela 10 - Valores do diâmetro médio e índice de polidispersão (entre parêntesis) das nanopartículas de PLA e PLA-PEG

Polímero	Formulação*	Diâmetro (nm) ± DPR e IP
PLA	F1 (T1%R5:1DCM)	375,97 ± 34,69 (0,236)
PLA	F2 (T2%R5:1DCM)	383,70 ± 24,92 (0,244)
PLA	F3 (T1%R3:1DCM)	361,27 ± 72,97 (0,187)
PLA	F4 (T2%R3:1DCM)	336,20 ± 106,77 (0,162)
PLA	F5 (T1%R5:1DCM+AE)	190,07 ± 40,75 (0,075)
PLA	F6 (T2%R5:1DCM+AE)	214,50 ± 17,55 (0,057)
PLA	F7 (T1%R3:1DCM+AE)	227,57 ± 9,57 (0,077)
PLA	F8 (T2%R3:1DCM+AE)	204,40 ± 23,85 (0,077)
PLA-PEG	F9 (T1%R5:1DCM)	376,57 ± 48,68 (0,219)
PLA-PEG	F10 (T2%R5:1DCM)	373,90 ± 34,67 (0,223)
PLA-PEG	F11 (T1%R3:1DCM)	282,03 ± 36,77 (0,118)
PLA-PEG	F12 (T2%R3:1DCM)	296,50 ± 12,37 (0,095)
PLA-PEG	F13 (T1%R5:1DCM+AE)	201,13 ± 27,82 (0,090)
PLA-PEG	F14 (T2%R5:1DCM+AE)	217,90 ± 33,79 (0,111)
PLA-PEG	F15 (T1%R3:1DCM+AE)	185,47 ± 69,02 (0,070)
PLA-PEG	F16 (T2%R3:1DCM+AE)	198,00 ± 24,33 (0,094)

(*n = 3; DPR = desvio padrão relativo; IP = Índice de polidispersividade)

Foram obtidas, em maior parte, populações monodispersas de nanopartículas, produzindo formulações que apresentaram baixos valores de IP. O tamanho das nanopartículas foi, em geral, considerado aceitável, e a introdução do copolímero PEG não gerou diferença significativa entre os grupos (teste *t* de Student para amostras independentes não demonstrado, $\alpha = 0,05$). Em formulações produzidas com o polímero PLA, o diâmetro médio das partículas variou de 383,70 nm (formulação F2) e 190,07 nm (formulação F5). As nanopartículas de PLA-PEG apresentaram diâmetro máximo de 376,57 nm (formulação F1) e mínimo de 185,4 nm (formulação F7).

Os resultados descritos divergem da maior parte dos estudos relatados na literatura, nas quais é descrito que o aumento da quantidade de polímero é desfavorável às nanopartículas, pois levam a formação de maiores diâmetros de partícula, devido ao aumento da frequência de colisão das unidades e uma consequente coalescência (BECK-BROICHSITTER et al, 2012; VITORINO et al, 2011). Por outro lado, alguns autores, já relataram esse fenômeno de redução do diâmetro médio das partículas com a utilização de copolímeros em bloco (TOBÍO et al, 1998; AMELLER et al, 2003). Tem-se pensado que esta modificação está ligada a característica anfifílica do conjunto polimérico, o que leva a uma diminuição da tensão interfacial do sistema (NECKEL & LEMOS-SENNA, 2005), com consequente diminuição do tamanho.

4.3.2 Influência dos fatores da composição frente ao diâmetro das nanopartículas de PLA

O diâmetro médio da partícula é um importante parâmetro a ser considerado na otimização de uma formulação, haja vista que essa característica pode influenciar diretamente no perfil biofarmacêutico e de liberação do fármaco a partir da nanoestrutura (HERMANS et al, 2012).

Com a finalidade de demonstrar se ocorreram diferenças significativas no diâmetro médio gerado pelas oito formulações diferentes de nanopartículas de PLA, foi efetuado o processo de análise fatorial a partir do estudo de análise da variância (ANOVA-fator único, dados não demonstrados). Esta análise comprovou a produção de tamanhos médios das nanopartículas diferentes significativamente, já que o valor de *F* calculado mostrou-se maior que o valor de *F* tabelado. Essa conclusão levou à necessidade de um desdobramento dos graus de liberdade. Essa ferramenta permite

isolar os fatores geradores de influência e os efeitos das interações entre os fatores (Tabela 11)

Tabela 11 – Desdobramento dos graus de liberdade realizado no estudo da influência dos fatores de formulação sobre o diâmetro das nanopartículas de PLA carregadas com RVT

Fonte de variação	Graus de liberdade	Soma dos quadrados	Média dos quadrados	Fcalculado	Ftabelado
T%	1	96,802	96,802	0,038	4,49
R	1	454,140	454,140	0,17	4,49
S	1	144429,135	144429,135	57,09*	4,49
T% x R	1	2424,06	2424,06	0,95	4,49
T% x S	1	129,735	129,735	0,05	4,49
R x S	1	3010,56	3010,56	1,19	4,49
T% x R x S	1	82,138	82,138	0,032	4,49
Tratamento	7	150626,571	21518,081	8,506	-
Resíduo	16	40474,966	2529,685	-	-
Total	23	191101,538			

T% = diferente porcentagem de tensoativo; R = razão entre fase aquosa:fase orgânica; S = diferentes composições de solvente; *Significativo à $\alpha = 0,05$.

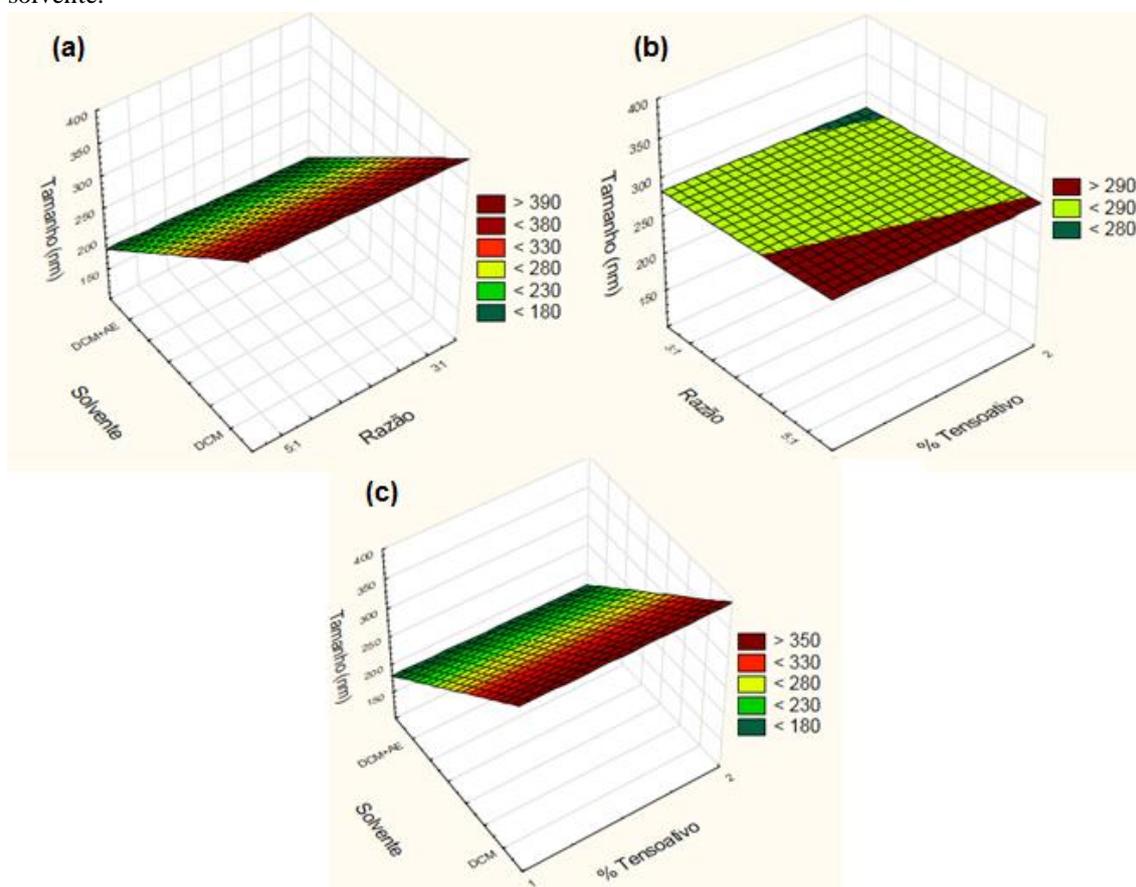
O desdobramento dos graus de liberdade identificou o solvente como único fator de modificação do tamanho das nanopartículas de PLA, sendo assim, a sua alteração foi o elemento causador de diâmetros finais diferenciados entre as formulações. Diante dessas informações, e após uma nova análise dos resultados apresentados na Tabela 10, sobre o tamanho das nanoesferas de PLA, pode-se concluir facilmente, que a utilização da mistura binária de solventes (DCM+AE, lotes a partir de F5), independentemente de T% e R, levou a produção de valores de diâmetro médio mais reduzido.

O teste de Tukey foi feito para confirmar esses resultados, comparando a menor diferença significativa (dcm) entre os lotes que utilizaram a mistura de solventes DCM+AE ou unicamente DCM. Todas as diferenças entre o diâmetro médio das nanopartículas foram significativas ($p < 0,05$).

Em seguida, verificou-se os padrões de interação entre as variáveis por representação gráfica a partir de curvas tridimensionais de superfície de resposta,

confrontando o tamanho de partícula como resposta à diferentes níveis de todos os pares de variáveis (Figura 17). A superfície de resposta da interação entre o solvente e a proporção de fases (gráfico 17(a)) e solvente e porcentagem de tensoativo (gráfico 17(c)) mostra claramente que a mistura de DCM e AE contribui para reduzir o tamanho de partícula. Pode-se também ser confirmado neste gráfico a não influência significativa do tensoativo e da proporção entre fases e da interação entre esses dois fatores (Gráfico 17(b)).

Figura 17 – Gráficos de superfície de resposta sobre o tamanho médio das nanopartículas de PLA: (a) efeito da proporção entre a fase aquosa e orgânica e tipo do solvente, (b) o efeito da porcentagem de tensoativo e razão entre a fase aquosa orgânica, (c) o efeito da porcentagem de tensoativo e tipo de solvente.



O resultado positivo atribuído aos solventes binários pode ser devido à maior solubilidade do solvente em água, garantida pela utilização de AE (parcialmente miscível em água). Esta partição é acompanhada por uma rápida precipitação do polímero podendo assim, produzir pequenas partículas (FREYTAG et al, 2000). Assim neste trabalho, Habib e colaboradores (2012) indicaram a forte correlação da composição orgânica com o diâmetro de sistemas nanométricos, e também observaram que a proporção entre as fases aquosa e orgânica não desempenhavam papel na alteração do tamanho das partículas produzidas com o polímero PLA. Esses autores reduziram o tamanho das nanocápsulas com a utilização de solventes com maior solubilidade em água combinado a um baixo ponto de ebulição (por exemplo, acetona), fazendo com que a evaporação do solvente acontecesse de forma mais rápida e mais eficaz. Mainardes e Evangelista (2005) demonstraram uma maior redução do tamanho médio da partícula utilizando AE, quando comparado às partículas produzidas utilizando DCM como fase orgânica para o processo de emulsão simples sendo que o tamanho de partícula foi reduzido de 340 nm (DCM) a 181 nm (AE). Song e colaboradores (2006) estudaram o impacto do solvente escolhido no comportamento do tamanho das nanopartículas de PLGA. O estudo revelou que os solventes com elevada capacidade de solubilizar-se em água acarretou tamanhos de partículas menores. Mas, mesmo assim, não foi descartada a possibilidade de que a redução ocorresse pela ação combinada do estabilizador (tensoativo) e do solvente, uma vez que as partículas resultantes da formação de gotículas de emulsão após a difusão do solvente orgânico, e o seu tamanho, dependem de forma abrupta da estabilidade dessas gotículas e da sua não coalescência, e por fim, esse resultado somente é alcançado quando o estabilizador pode permanecer na camada de líquido-líquido do sistema.

É muito provável que a dimensão das partículas dependa diretamente do tamanho do glóbulo formado no processo de emulsificação (QUINTANAR-GUERRERO et al, 1996) e a maior parte dos estudos publicados mostram a diminuição do tamanho de partícula resultante de um aumento da concentração e/ou a combinação de agentes tensoativos (AHLIN et al, 2002). Em nosso estudo, o tensoativo não influenciou no tamanho das nanopartículas de PLA, possivelmente devido ao fato de que, mesmo em pequena concentração (1%) conseguiu-se produzir uma cobertura eficaz da interface O/A ou, que tenha ocorrido uma saturação do sistema, e o excesso de tensoativo foi simplesmente acumulado na fase contínua, sem qualquer função emulsionante ou

estabilizante (JALIL & NIXON, 1990). Quintanar-Guerrero e colaboradores (1996) demonstraram que a diminuição no tamanho das partículas, como resposta ao aumento de tensoativo era saturável até 5 % de sua concentração.

4.3.3 Influência dos fatores da composição frente ao diâmetro das nanopartículas de PLA-PEG

Quando administrados por via intravenosa, transportadores coloidais convencionais de fármacos podem ser rapidamente eliminados da circulação sanguínea pelo sistema fagocítico mononuclear, principalmente representado pelas células Kupfer do fígado e macrófagos do baço. Entre os polímeros que reduzem drasticamente a interação com as proteínas sanguíneas, o PEG tem sido extensivamente investigado (MOSQUEIRA et al, 2001).

O teste ANOVA realizado a partir dos dados de tamanho médio das nanopartículas produzidas a partir de misturas de PLA-PEG indicam que as alterações dos parâmetros de formulação geraram características diferentes no diâmetro das partículas ($F_{\text{calculado}} \{23,57736\} > F_{\text{tabulado}} \{2,657197\}$).

Posteriormente, um ANOVA com desdobramento dos graus de liberdade foi realizado para verificar a influência de fatores isolados e suas interações no tamanho médio das nanopartículas de PLA-PEG (Tabela 12).

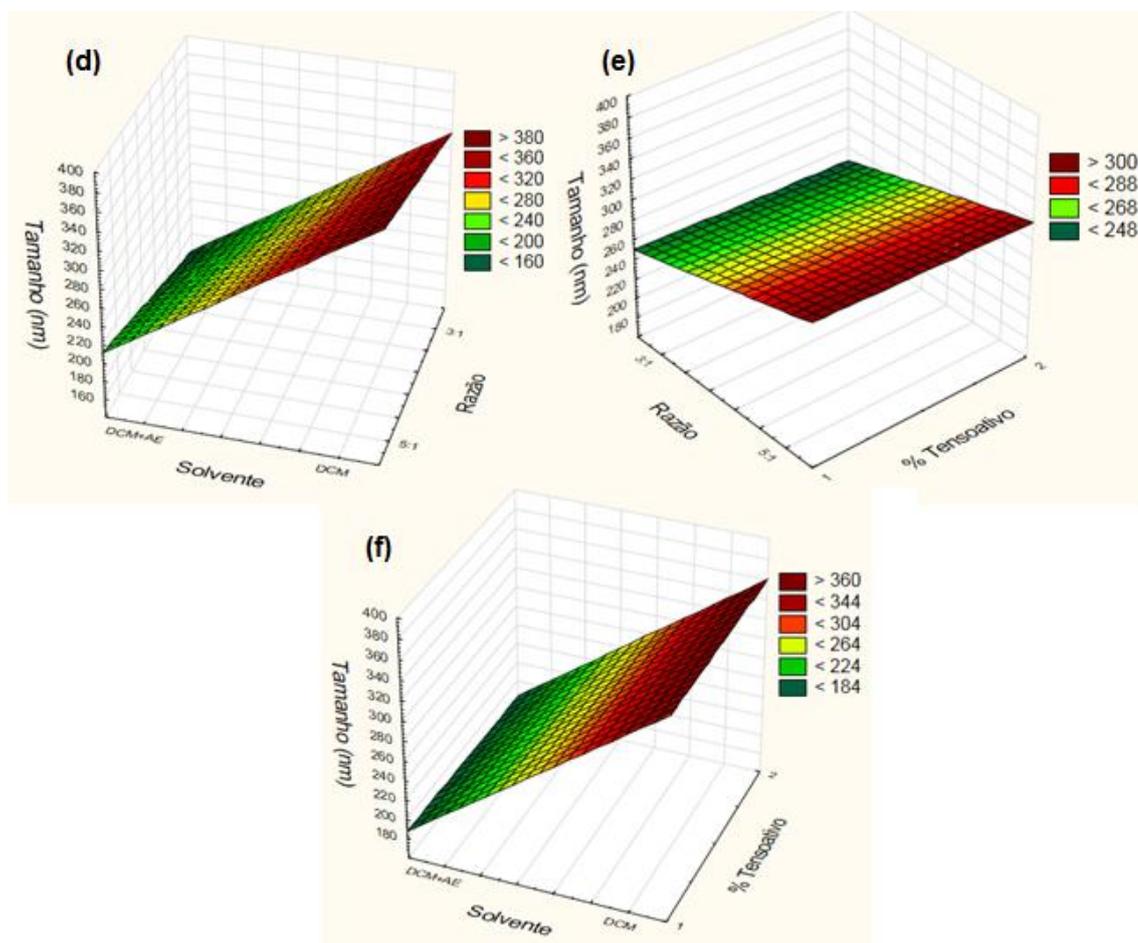
Tabela 12 - Desdobramento dos graus de liberdade no estudo da influência dos fatores de formulação sobre o diâmetro das nanopartículas de blendas de PLA-PEG carregadas com RVT

Fonte de variação	Graus de liberdade	Soma dos quadrados	Média dos quadrados	Fcalculado	Ftabelado
T%	1	633,457	633,457	0,816	4,49
R	1	16146,097	16146,097	20,810*	4,49
S	1	103950,847	103950,847	133,979*	4,49
T% x R	1	61,543	61,543	0,079	4,49
T% x S	1	114,841	114,841	0,148	4,49
R x S	1	6973,447	6973,447	8,98*	4,49
T% x R x S	1	14672,057	14672,057	18,91*	4,49
Tratamento	7	128052,289	18293,18	23,57	-
Resíduo	16	12414,06	775,87	-	-
Total	23	140466,3563			

T% = diferente porcentagem de tensoativo; R = razão entre fase aquosa:fase orgânica; S = diferentes composições de solvente; *Significativo à $\alpha = 0,05$.

Os resultados mostraram que, entre os fatores estudados, o fator S e o fator R, tanto de forma isolada como a interação entre eles, influenciam no tamanho das partículas de PLA-PEG, bem como a interação dos três fatores (%T, S e R). As curvas tridimensionais de superfície de resposta foram utilizadas para demonstrar a relação e a interação entre as variáveis e o tamanho médio das nanopartículas de PLA-PEG (Figura 18 (d), (e) e (f)).

Figura 18 - Gráficos de superfície de resposta sobre o tamanho médio das nanopartículas de PLA-PEG: (d) efeito da relação entre fase aquosa e orgânica e o tipo de solvente, (e) o efeito da porcentagem de tensoativo e razão entre aquosa e fase orgânica, (f) efeito da porcentagem de tensoativo e tipo de solvente.



O tamanho das partículas diminuiu quando a fase orgânica utilizada foi composta de DMC+AE (lote (d) e (f)) e, neste caso, o teste de Tukey foi significativo em todas as formulações ($p < 0,05$). Tal como aconteceu com as nanopartículas de PLA, a concentração do tensoativo isoladamente não influenciou nesse parâmetro (Figura 18 (e) e (f)), tal como foi confirmado por Tukey ($p > 0,05$). Também a menor razão entre as fases apresentou um efeito positivo na redução do tamanho de partícula, independente da concentração de PVA (Figura 18 (e)), mas dependente do solvente (Figura 18 (d)). O teste de Tukey mostrou que a interação entre S e R foi significativo apenas com DCM, para o qual a razão elevada aumentou o diâmetro médio. A interação entre os três fatores e os seus níveis foram confirmadas pelo teste de Tukey, uma vez que foi considerado significativo em todas as formulações ($p < 0,05$). Isto significa que, quando os três fatores mudam, o tamanho médio das nanopartículas altera significativamente.

Ao analisar a Tabela 10 pode-se observar o efeito positivo da formulação 16 (DCM + EA, proporção de 3:1 entre as fases e 2% de PVA), que apresenta o diâmetro médio de $198,00 \pm 24,33$ nm e PI de 0,09 e o efeito negativo de formulação F9 (DCM, proporção 5:1 entre as fases e 1% de PVA), com diâmetro médio de $376,57 \pm 48,68$ nm e PI de 0,22. A influência do solvente no tamanho foi discutido acima e é aplicável a estes resultados. A razão entre as fases interna e externa da emulsão é de grande importância para a sua estabilidade e influencia na característica final de tamanho das gotículas dispersas (MAINARDES & EVANGELISTA, 2005).

4.3.4 Determinação da eficiência de encapsulação de nanopartículas de PLA e PLA-PEG

A eficiência de encapsulação (EE%) do RVT nas nanopartículas foi determinada indiretamente (seção 3.3.5.2), e os resultados para as 16 formulações estão apresentados na Tabela 13.

Tabela 13 - Valores de eficiência de encapsulação do RVT nas suspensões das nanopartículas

Polímero	Formulação	EE% (média* ± DPR)
PLA	F1 (T1%R5:1DCM)	56,28 ± 11,56
PLA	F2 (T2%R5:1DCM)	43,52 ± 4,31
PLA	F3 (T1%R3:1DCM)	84,46 ± 4,12
PLA	F4 (T2%R3:1DCM)	55,08 ± 5,21
PLA	F5 (T1%R5:1DCM)	47,46 ± 2,42
PLA	F6 (T2%R5:1DCM+AE)	25,64 ± 4,01
PLA	F7 (T1%R3:1DCM+AE)	82,47 ± 11,10
PLA	F8 (T2%R3:1DCM+AE)	46,31 ± 6,40
PLA-PEG	F9 (T1%R5:1DCM)	58,64 ± 9,56
PLA-PEG	F10 (T2%R5:1DCM)	47,96 ± 8,98
PLA-PEG	F11 (T1%R3:1DCM)	78,81 ± 5,76
PLA-PEG	F12 (T2%R3:1DCM)	52,02 ± 4,17
PLA-PEG	F13 (T1%R5:1DCM+AE)	40,00 ± 3,22
PLA-PEG	F14 (T2%R5:1DCM+AE)	40,91 ± 3,28
PLA-PEG	F15 (T1%R3:1DCM+AE)	75,67 ± 6,56
PLA-PEG	F16 (T2%R3:1DCM+AE)	42,71 ± 6,23

*n = 3; DPR = desvio padrão relativo

A EE% do RVT nas nanopartículas foi em maior parte satisfatória. Nas formulações que contêm apenas o polímero PLA, a EE% variou de 25,64 ± 4,01 % (F6) a 84,46 ± 4,12 % (F3). Para nanopartículas à base de PLA-PEG, a EE% variou entre 40,0 ± 3,22 % (F13) e 78,81 ± 5,76 % (F11). Os resultados da EE% apresentaram grandes variações dependentes da combinação dos fatores estudados. Isso sugere que pequenas alterações na formulação podem ter grandes consequências para as características finais das nanopartículas. De acordo com a tabela 13, a adição de PEG não alterou significativamente a EE% (confirmado com o teste t de *Student* não mostrado, $\alpha = 0,05$ %). As variações na EE% relatados para as formulações de PLA foram seguidos por aqueles que contêm PLA-PEG, uma vez que a diminuição ou o aumento da capacidade EE% das nanopartículas de PLA também foram acompanhados pelas respectivas mudanças nas nanopartículas de PLA-PEG. O fato de que o PEG não influenciou o carregamento do RVT pode estar ligada ao modo do associação de RVT

ao polímero, que possivelmente tenha uma associação menos superficial e mais interna às nanopartículas. Caso contrário, se o RVT tivesse maior quantidade de interações superficiais, a interação PLA-fármaco poderia ser prejudicada pela interação PLA-PEG superficial.

4.3.5 Influência dos fatores da composição frente à eficiência de encapsulação de nanopartículas de PLA

Com base no estudo ANOVA dos resultados de EE%, assumiu-se que existem diferenças significativas entre os resultados gerados pela modificação dos fatores de composição para as nanopartículas de PLA ($F_{\text{calculado}} \{31,64692\} > F_{\text{tabelado}} \{2,657196\}$). Posteriormente, uma análise de variância com desdobramento dos graus de liberdade foi realizado para verificar a influência dos fatores isolados e suas interações na EE% do RVT em nanopartículas de PLA (Tabela 14).

Tabela 14 - Desdobramento dos graus de liberdade realizado no estudo da influência dos fatores de formulação sobre a EE% das nanopartículas de PLA carregadas com RVT

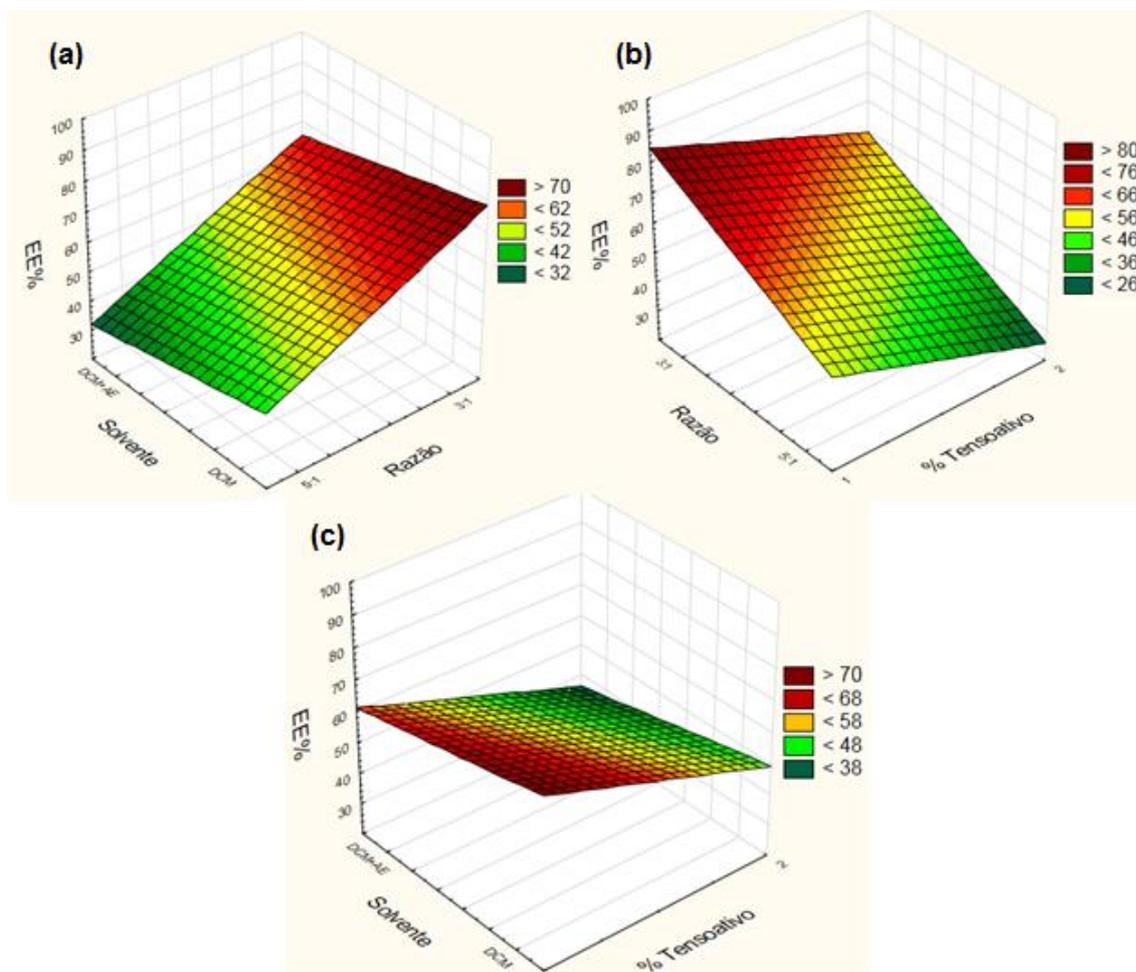
Fonte de variação	Graus de liberdade	Soma dos quadrados	Média dos quadrados	Fcalculado	Ftabelado
T%	1	3759,25	3759,25	100,94*	4,49
R	1	3414,60	3414,60	91,69*	4,49
S	1	526,31	526,31	14,13*	4,49
T% x R	1	359,84	359,84	9,55*	4,49
T% x S	1	94,42	94,42	2,53	4,49
R x S	1	95,24	95,24	2,55	4,49
T% x R x S	1	2,013	2,013	0,054	4,49
Tratamento	7	8251,470	1178,781	31,64	-
Resíduo	16	595,966	37,24	-	-
Total	23	8847,436			

T% = diferente porcentagem de tensoativo; R = razão entre fase aquosa:orgânica; S = diferentes composições de solvente; *Significativo à $\alpha = 0,05$.

As três variáveis envolvidas interferem diretamente na capacidade de

carregamento do fármaco e também há uma interação entre T% e R. Mas, o solvente não tem o seu efeito influenciado por outros fatores, como também foi observado no estudo fatorial relacionado ao tamanho das nanopartículas de PLA. As curvas tridimensionais de superfície foram utilizadas para demonstrar a relação e a interação entre as variáveis e a resposta (EE%) (Figura 19 (a), (b) e (c)). Os gráficos 19 (a) e 19 (b) mostram que a diminuição da razão entre as fases aquosa e orgânica resulta em um resultado positivo em termos de EE%. Tomando F3 x F1 como um exemplo, em que a única diferença entre as formulações é a proporção entre as fases (F3 = 3:1 e F1 = 5:1), um grande aumento em EE% pode ser observado, 56,28% (F1) a 84,46% (F3) (tabela 13). Resultado confirmado pelo teste de Tukey, com exceção na interação R com PVA 2% e DCM ($p > 0,05$). A porcentagem de tensoativo exibe grande influência sobre EE% do RVT (Figura 19(b) e 19c)). Aumentando-se a concentração de PVA (ex. F3 - 1% para F4 - 2%), diminuiu-se a EE% (ex. F3 = 84,46% para F4 = 55,08%). O teste de Tukey não mostrou influência do tensoativo em apenas um caso: a interação com DCM e R5:1 ($p > 0,05$). O mesmo (Gráfico 19 (a) e 19(c)) mostra que o DCM tem um ligeiro efeito no aumento da EE%. O teste de Tukey mostrou que a influência do solvente foi significativo apenas na interação com 2% de PVA e R5:1, na qual o DCM contribuiu para aumentar EE% em comparação com DCM+EA ($p < 0,05$). Nas outras interações, a influência de solventes não foi significativa ($p > 0,05$). A formulação que apresentou a mais baixa EE% (25,64 %) foi F6, constituído por todos os fatores que contribuem negativamente para o carregamento de droga (DCM + EA, proporção de 5:1 e PVA a 2%).

Figura 19 – Gráfico de superfície resposta sobre a EE% em nanopartículas de PLA: (a) efeito da proporção entre a fase aquosa e orgânica e o tipo do solvente, (b) efeito da porcentagem de tensoativo e razão entre a fase aquosa e orgânica, (c) efeito da porcentagem de tensoativo e do tipo de solvente.



No que diz respeito à influência do solvente, pode-se afirmar que o mesmo solvente que proporciona uma diminuição do diâmetro médio das nanopartículas podem interferir na encapsulação do RVT. Isso ocorre, uma vez que a capacidade de partição maior e mais rápida para a fase aquosa da emulsão devido à miscibilidade superior com água resulta em uma precipitação rápida do polímero podendo auxiliar na diminuição do diâmetro médio, mas, pode também levar a baixa incorporação do fármaco no partícula (FREYTAG et al, 2000). Além disso, a EE% depende das propriedades físicas e químicas dos polímeros, sistemas de solventes, a interação fármaco-polímero e as propriedades da fase contínua. A possível razão da diminuição da EE% na presença de

grande quantidade de tensoativo e o alto teor de água pode ser devido a essas condições propiciarem uma solubilização superior do fármaco na fase aquosa (DUPEYRÓN et al, 2013).

4.3.6 Influência dos fatores da composição frente à eficiência de encapsulação para as nanopartículas de PLA-PEG

Uma investigação da influência dos fatores da formulação na EE% do RVT nas nanopartículas de PLA-PEG foi efetuada. A análise de variância demonstrou a interferência dos fatores nesse parâmetro ($F_{\text{calculado}} \{16,3592666\} > F_{\text{tabelado}} \{2,6571966\}$). A análise de variância com desdobramento dos graus de liberdade demonstrou, neste caso, uma influência de todos os fatores no valor da EE%, além da interação entre R e T% (Tabela 15).

Tabela 15 - Desdobramento dos graus de liberdade no estudo da influência dos fatores de formulação sobre a EE% das blendas de PLA-PEG carregadas com RVT

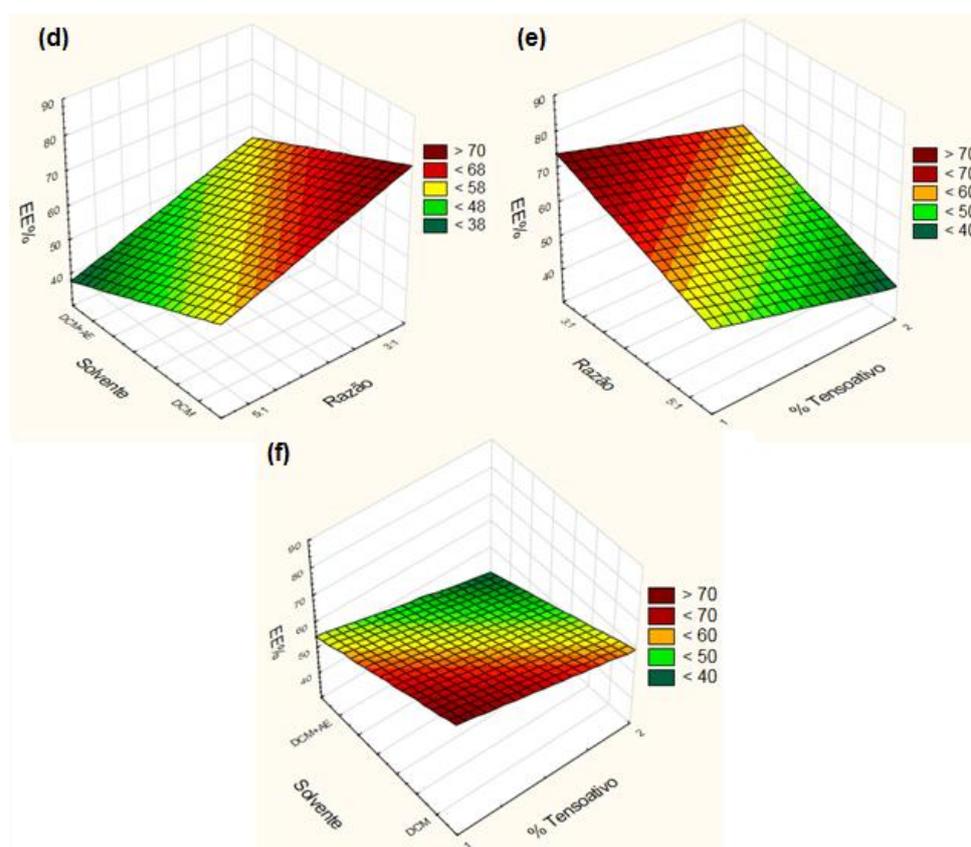
Fonte de variação	Graus de liberdade	Soma dos quadrados	Média dos quadrados	Fcalculado	Ftabelado
T%	1	1807,44	1807,44	42,10*	4,49
R	1	1421,35	1421,35	33,10*	4,49
S	1	539,943	539,943	12,57*	4,49
T% x R	1	942,09	942,09	21,94*	4,49
T% x S	1	16,517	16,517	0,38	4,49
R x S	1	71,097	71,097	1,65	4,49
T% x R x S	1	118,323	118,323	2,756	4,49
Tratamento	7	4916,767	702,395	16,359	-
Resíduo	16	686,970	42,935		-
Total	23	5603,737			

T% = diferente porcentagem de tensoativo; R = razão entre fase aquosa:orgânica; S = diferentes composições de solvente; *Significativo à $\alpha = 0,05$.

Os gráficos tridimensionais de superfície resposta foram construídos para verificar a relação e a interação entre os fatores da formulação frente a EE% do RVT nas nanopartículas de PLA-PEG (Figura 20 (d), (e) e (f)). No gráfico (d) e (f) observa-se

que o solvente DCM apresenta um ligeiro efeito positivo no carregamento do fármaco. O teste de Tukey mostrou que o aumento da EE% é influenciado por DCM, apenas na presença de 1% de PVA e na razão de 5:1 ($p < 0,05$), enquanto que o solvente DCM+AE diminui a EE% na presença desses fatores. Para outras combinações de fatores com o solvente, não foram exibidas influência sobre a EE% ($p > 0,05$). A diminuição na relação entre a fase aquosa e orgânica contribui para aumentar o carregamento do fármaco (Gráficos 20 (d) e (e)). O teste de Tukey indicou que este parâmetro é significativo ($p < 0,05$), quando associado com PVA a 1%, para ambos os solventes. A influência do tensoativo (Gráficos 20 (e) e (f)) na EE% é negativa quando a concentração é aumentada. O teste de Tukey mostrou que a influência significativa ($p < 0,05$) do tensoativo na interação com R3:1 e com ambos os solventes. A formulação que apresentou a maior EE% ($F11 = 78,81\%$) foi composta por todos os parâmetros que contribuem positivamente para a encapsulação do fármaco (DCM, proporção de 3:1 e 1% de PVA).

Figura 20 - Gráfico de superfície resposta sobre a EE% em nanopartículas de PLA-PEG: (d) efeito da proporção entre a fase aquosa e orgânica e o tipo do solvente, (e) efeito da porcentagem de tensoativo e a razão entre a fase aquosa e orgânica, (f) o efeito da porcentagem de tensoativo e tipo de solvente.



4.3.7 Formulação otimizada

Uma nanoformulação otimizada deve compreender dois parâmetros: alta eficácia de encapsulação do fármaco e pequeno e uniforme tamanho de partícula. Com base nos resultados anteriores, pode-se afirmar que: i) tanto para as nanopartículas de PLA, quanto para as de PLA-PEG, a mistura binária de solventes contribuiu para reduzir o tamanho das nanopartículas. Mas, em contrapartida, o carregamento do RVT foi reduzido, em comparação com formulações à base de DCM; ii) observou-se que uma proporção menor de solução aquosa para a fase orgânica (3:1) influenciou de forma positiva tanto no carregamento do fármaco, quanto no tamanho das partículas, para ambas as nanoformulações; iii) o tensoativo na concentração de 1% apresentou efeito positivo sobre a carga de fármaco e o tamanho médio de partícula.

Assim, a escolha diferencial para compor a formulação aperfeiçoada está baseada no uso de um solvente que proporcione um melhor encapsulamento, ou uma combinação binária de solventes, que minimize o diâmetro médio das partículas. Essa escolha deve levar em conta a finalidade do produto, uma vez que diferentes objetivos podem exigir características específicas. No entanto, neste caso, o teste de Tukey demonstra que as formulações com T1% e R3:1 tanto para formulações com PLA, quanto para as formadas com PLA-PEG, não mostram nenhuma diferença significativa na EE% quando produzida com ou sem a presença de AE (F3 x F7 - PLA, F11 x F15 - PLA-PEG) (Tabela 16). Portanto, a escolha do solvente para uma formulação aperfeiçoada foi focada na otimização do diâmetro médio. Finalmente, as formulações de nanopartículas otimizados de PLA e PLA-PEG foram produzidas com DCM+AE, R3:1 e 1% de tensoativo (PVA) (F7 para as nanopartículas de PLA e F15 para as nanopartículas de PLA-PEG).

Tabela 16 - Diferenças absolutas entre as médias da EE% para as nanopartículas de PLA e PLA-PEG carregadas com RVT, obtidas nos lotes que receberam tratamento com 1% de tensoativo (PVA) e razão entre fase aquosa:fase orgânica 3:1

Formulações PLA	dms	Diferença absoluta entre as médias	Formulações PLA-PEG	dms	Diferença absoluta entre as médias
F3xF7	9,96	1,99 ^{NS}	F11 x F15	10,7	3,14 ^{NS}

dms = diferença mínima significativa; ^{NS} = não significativo; $\alpha = 0,05$;

4.4 Caracterização físico-química das nanopartículas obtidas a partir da formulação otimizada

4.4.1 Potencial zeta

A carga superficial pode influenciar significativamente a estabilidade de uma partícula em suspensão. De um modo geral, quanto maior for o valor absoluto do potencial zeta, mais estável será o sistema formado. Essa forte influencia está ligada as características de repulsão eletrostática entre as partículas, sendo que, as interações repulsivas entre elas aumentam em uma ordem direta ao aumento do potencial zeta, conduzindo à formação de partículas mais estáveis com um tamanho mais uniforme (FROZZA et al, 2010, JAIN & SARAF, 2009)

Em geral, as partículas podem ser consideradas estáveis quando o valor absoluto do potencial zeta é próximo de 30 mV, enquanto que potenciais próximos a 0 e 5 mV podem produzir o fenômeno de floculação mais facilmente (NEVES et al, 2013).

Como demonstrado na Tabela 17, as análises de potencial zeta indicaram a obtenção de partículas de carga negativa, decorrentes provavelmente da presença superficial de PLA, um polímero aniônico, devido à presença de grupamentos carboxílicos nas extremidades da cadeia polimérica (ALLEN, 1994) e a, provavelmente, baixa quantidade de PEG ou P80 revestindo a superfície das nanopartículas.

Todas as nanoformulações apresentaram uma média elevada de potencial negativo (média de -17,63 mV), independentemente da incorporação de RVT, sugerindo que o fármaco não alterou de forma significativa o potencial zeta das nanopartículas poliméricas. Portanto, as nanopartículas poliméricas desenvolvidas no presente trabalho

são consideradas estáveis fisicamente, devido à forte repulsão eletrostáticas conferidas pela natureza química da matriz polimérica (NEVES et al, 2013).

Além disso, a característica negativa da superfície das nanopartículas, pode proporcionar maior tempo de permanência no sangue, já que partículas carregadas positivamente, muitas vezes exibem uma rápida depuração do sangue juntamente com uma elevada acumulação no pulmão e no fígado (LI & HUANG, 2008). Portanto, a fim de alcançar um perfis farmacocinéticos e de biodistribuição desejáveis com a finalidade de melhorar a liberação do fármaco no SNC, é de grande importância controlar cuidadosamente a carga de superfície dos sistemas carreadores.

Tabela 17 - Análise do potencial zeta das dispersões coloidais preparadas na ausência e na presença de RVT, dispersas em água

Formulação	Potencial Zeta (mV)
Nanopartículas de PLA (controle negativo)	-11,5 ± 6,7
Nanopartículas de PLA_RVT	- 16,1 ± 4,8
Nanopartículas de PLA-PEG (controle negativo)	-22,8 ± 10,0
Nanopartículas de PLA-PEG_RVT	- 19,2 ± 6,0
Nanopartículas de PLA-P80 (controle negativo)	-14,4 ± 6,98
Nanopartículas de PLA-P80_RVT	-21,8 ± 4,65

4.4.2 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho

A análise por FT-IR é um estudo de extrema importância, pois permite verificar se foi conseguido manter a integridade tanto dos componentes formadores das nanoesferas, quanto do fármaco, após o processo de obtenção de nanopartículas carregadas com RVT.

A figura 21 mostra os espectros de FT-IR dos polímeros, do fármaco RVT e do tensoativo isolados. O poliéster PLA (figura 21(a)) apresentou bandas características, com uma banda próximas a 3600 cm⁻¹ referente aos grupos hidroxilas e em 1757,7 cm⁻¹, a banda referente a ligação C=O de éster (BARWAL et al, 2013), sendo esta a principal banda típica do polímero PLA nas análises restantes.

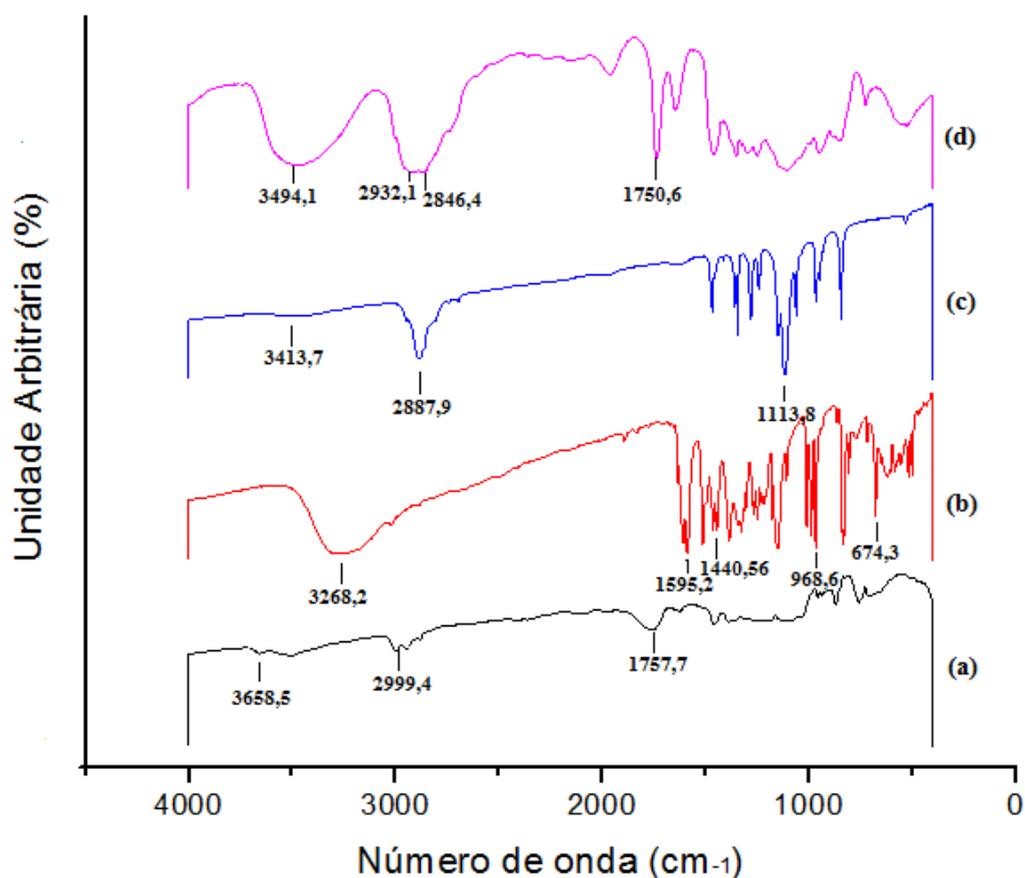
O espectro gerado a partir da análise de uma alíquota de RVT (fig 21(b)) foi consistente com os resultados encontrados por outros grupos de pesquisadores (BILLES

et al, 2007, SHI et al, 2008; KIM et al, 2012), apresentando uma banda de absorção larga próxima a 3270 cm^{-1} referente às vibrações do grupamento OH, três bandas de intensidade média a alta entre $1440\text{-}1600\text{ cm}^{-1}$ provenientes do estiramento das ligações C=C aromáticas e uma forte banda de absorção resultante de deformação angular C-H fora do plano do anel aromático foi observada em $\sim 670\text{ cm}^{-1}$. Por fim, uma banda de grande importância entre $960\text{ e }970\text{ cm}^{-1}$ decorrente dos carbonos olefinos *trans*, foi verificada comprovando que o fármaco utilizado tratava-se da conformação ativa da molécula (COATES, 2000).

Para o polímero PEG (figura 21(c)), as absorções características são observadas próximo à 3400 cm^{-1} , devido aos grupos hidroxilas terminais associados por pontes de hidrogênio, próximo à 1110 cm^{-1} , absorção característica de grupamentos C-O-C de éteres dialquílicos e como todo composto orgânico que possui cadeia alifática uma banda próxima a 2900 cm^{-1} referentes ao grupamento C-H (SILVERSTEIN & WEBSTER, 2000).

O Polissorbato 80 (figura 21(d)) é uma mistura de ésteres de ácidos graxos, principalmente de ácido oléico e sorbitol e seus anidros etoxilados com aproximadamente 20 mols de óxido de etileno para cada mol de sorbitol e anidros de sorbitol. Neste estudo, seu espectro FT-IR foi característico e de acordo com a literatura que descreve bandas em aproximadamente $3494,1\text{ cm}^{-1}$ $2932,1\text{ cm}^{-1}$ de estiramento assimétrico e $2846,4\text{ cm}^{-1}$ de estiramento simétrico, referentes às vibrações geradas pelas ligações O-H e CH₂, respectivamente. Outra banda de grande importância na análise do P80 foi observada em $1750,6\text{ cm}^{-1}$, decorrente da banda acentuada e simétrica de absorção, devido à vibração de estiramento de C = O do grupo carbonila do éster (Li et al, 2012).

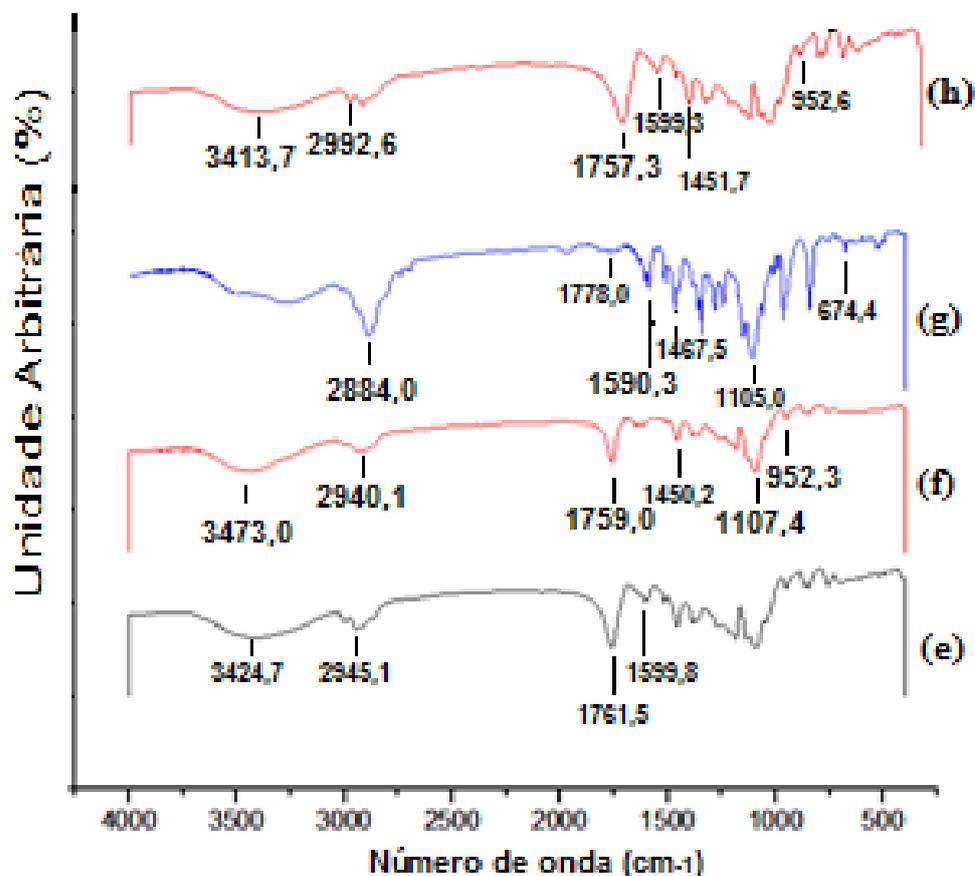
Figura 21 - Espectro de FT-IR das amostras: (a) polímero PLA, (b) fármaco RVT, (c) polímero PEG, (d) tensoativo P80



A Figura 22 mostra os espectros de FT-IR da mistura física de PLA-PEG_RVT (figura 22(g)), o qual apresentou a sobreposição dos espectros das substâncias isoladas, assim como os espectros referentes as três composições de nanopartículas carregadas com RVT (figura 22 (e), (f), (h)).

Resumidamente, a análise espectral das amostras indicou que manteve-se quase que inalterados os grupos funcionais específicos de cada material sugerindo então, que não ocorreram interações moleculares que alterassem a estrutura química do fármaco ou dos componentes da partícula, durante o processo de produção.

Figura 22 - Espectro de FT-IR das amostras: (e) nanopartícula de PLA-P80 carregada com RVT, (f) nanopartícula de PLA-PEG carregada com RVT (g) mistura física de PLA, PEG e RVT, (h) nanopartícula de PLA carregada com RVT



4.4.3 Ensaio de difração de raios X

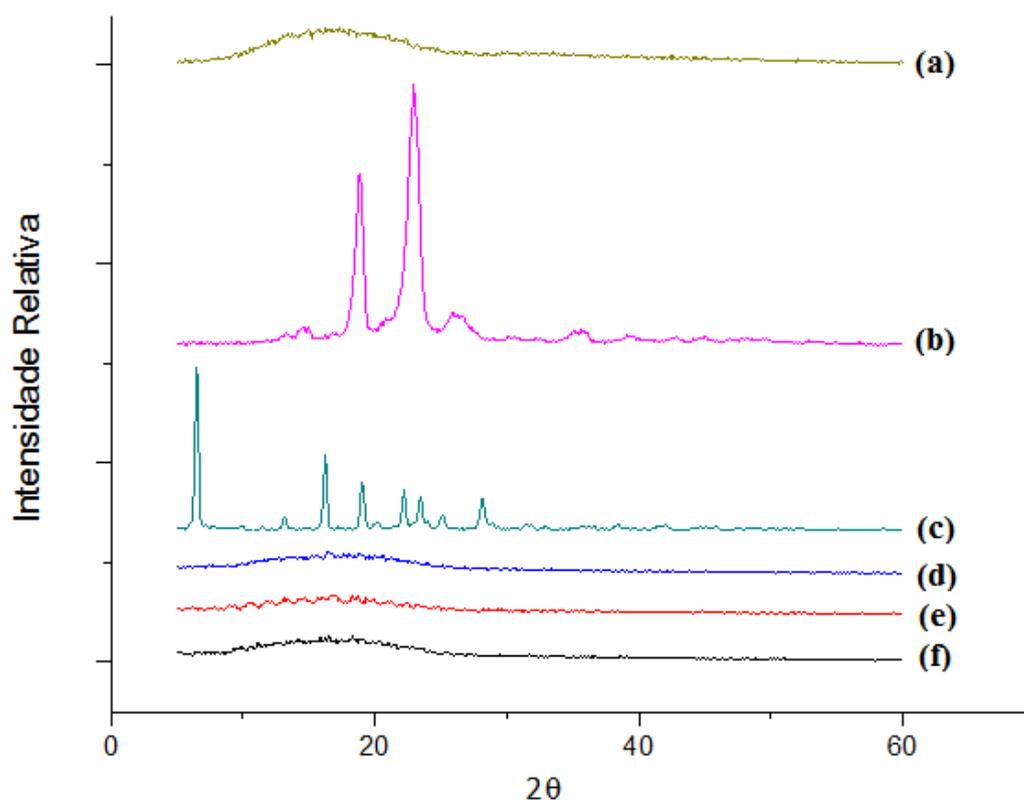
Substâncias no estado sólido podem revelar características cristalina e/ou amorfa. A análise dessa característica do sistema é de suma importância, já que a cristalinidade afeta significativamente a saturação da solubilidade e a velocidade de dissolução no processo de entrega (controle de liberação do fármaco). A DRX pode efetivamente distinguir sistemas/materiais entre cristalinos e amorfos, sendo que substâncias cristalinas apresentam-se com picos bem definidos e, compostos amorfos não apresenta os mesmos planos nítidos característicos dos cristais (DHIRENDRA et al, 2009).

Em geral, sólidos amorfos são mais solúveis do que as formas cristalinas devido à energia livre envolvida no processo de dissolução. Sólidos amorfos possuem moléculas dispostas aleatoriamente e, portanto, baixo consumo de energia é necessário separá-las.

Consequentemente, sua taxa de dissolução é mais rápida do que quando na forma de cristal (RIEKES et al, 2011).

Os padrões de DRX das matérias-primas PLA e PEG, do RVT, e das nanopartículas de PLA, PLA-PEG e PLA-P80 contendo RVT produzidas pelo método de emulsão evaporação estão apresentados na figura 21.

Figura 23 – Difratomogramas de (a) PLA, (b) PEG, (c) RVT livre (d) nanopartículas de PLA-P80 (e) nanopartículas de PLA-PEG e (f) nanopartículas de PLA



O difratograma do RVT livre (figura 21(c)) exibiu intensos picos cristalinos, entre 5 e 30°, indicando que o RVT possui forma cristalina. O difratograma obtido está de acordo com o observado na literatura (NAM et al, 2005; MENDES et al, 2012).

As propriedades físicas do PLA variam de acordo com a massa molar e densidade do produto, podendo apresentar característica amorfa ou semicristalina, dependendo da sua estereoquímica, do tratamento térmico recebido e da sua temperatura de transição vítrea, sendo estas características, que determinam também a sua utilização comercial (HENTON et al, 2005). A figura 21(a), demonstra o difratograma obtido com uma amostra de PLA (Sigma Aldrich – Poly(L-lactide) – P1566) utilizado na produção das

nanopartículas. A análise revelou a utilização de um polímero amorfo, representado por um halo largo entre aproximadamente 0 a 20°.

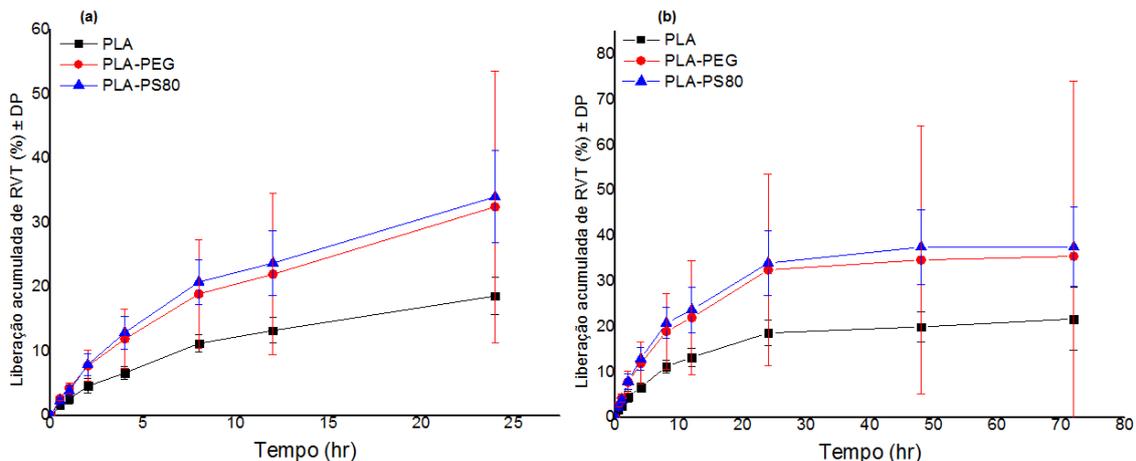
O PEG (figura 21(c)), polímero empregado na modificação superficial da nanopartícula, apresenta caráter semicristalino (KÜRTI et al, 2011), com picos característicos em 2θ : 14,88; 19,12; 23,30; 26,26; 26,88° (VASSILIOU et al, 2010).

A análise dos difratogramas referente às nanopartículas formuladas (Figura 21(d), (e) e (f)) resultou em padrões com grandes semelhanças entre eles, e com uma mudança significativa quando comparado à cristalinidade do RVT e a semicristalinidade do PEG, caracterizando as formulações obtidas como amorfas. Esse resultado pode ser atribuído à dispersão molecular entre fármaco e polímero(s), levando a uma alteração das características de cristalinidade de alguns componentes, resultando então, em nanopartículas de caráter amorfo, para as quais se espera melhores características de dissolução do RVT.

4.4.4 Estudo de liberação *in vitro*

O perfil de liberação das formulações foi avaliado e, como previsto para as nanopartículas poliméricas, uma liberação sustentada foi observada. Na figura 24 pode-se observar o perfil de liberação do RVT a partir das nanopartículas nas primeiras 24 h (Figura 24 (a)), e durante todo o experimento de 72 h (Figura 24 (b)). As nanopartículas mostraram um padrão de liberação bifásico, com um “burst” de liberação inicial, seguido de uma liberação mais lenta. As nanopartículas de PLA apresentaram uma taxa de liberação de RVT mais lenta do que as nanopartículas PLA-PEG e PLA-P80 ($p < 0,05$). Em 24 h (Figura 24 (a)) as nanopartículas de PLA liberaram aproximadamente 18% do RVT e as nanopartículas de PLA-PEG e PLA-P80 liberaram 32% e 34% respectivamente. No final das 72 horas, houve uma liberação acumulada de RVT de 21,7% a partir de nanopartículas de PLA e de 35,5 e 37,5% a partir de nanopartículas de PLA-PEG e PLA-P80, respectivamente. Finalmente, o tempo para liberar 50% do fármaco ($t_{50\%}$) foi calculada para todas as formulações, obtendo-se resultado de aproximadamente 203,7, 113,5, e 104,0, para formulações de PLA, PLA-PEG e PLA-P80 respectivamente.

Figura 24 - Porcentagem de liberação acumulada *in vitro* de RVT a partir de nanopartículas de PLA, PLA-PEG e PLA-P80 em solução de PBS a $37 \pm 0,5$ °C. Em (a), é mostrado o perfil de liberação de RVT em 24 h. Em (b), é mostrado o perfil de liberação de RVT em 72 h. Os dados representam a média \pm DP ($n = 2$)



A modelagem matemática dos dados de liberação mostraram que, de acordo com os coeficientes de determinação (R^2) (tabela 18) os dados de liberação *in vitro* foram a favor da cinética do tipo Higuchi para as três nanoformulações. O modelo de Higuchi é muitas vezes usado para descrever a liberação a partir de sistemas de matriz em que a fração de fármaco liberada é proporcional à raiz quadrada do tempo (SIEPMANN & PEPPAS, 2001). Como também visto na tabela 18, o valor de n calculado para a liberação de RVT a partir de nanopartículas indicou que o transporte anômalo foi o mecanismo de liberação principal. Isto é, o fármaco é liberado a partir do sistema de nanopartículas por uma ação combinada de difusão e relaxamento das cadeias poliméricas que pode conduzir ao inchaço ou a erosão do polímero. O n é indicativo do mecanismo de liberação do fármaco. Se o n é de 0,45 ou menos, o mecanismo de liberação segue a difusão fickiana; valores na faixa de $0,45 < n < 0,89$ indicam transporte anômalo do ativo (liberação controlada por uma combinação de difusão e de relaxamento do polímero). Quando n atinge um valor de 0,89, ou acima, o mecanismo de liberação do fármaco é considerado como o transporte caso II, que envolve o relaxamento e da desestruturação da cadeia do polímero (RITGER & PEPPAS, 1987).

Tabela 18 - Análise cinética da liberação de RVT a partir de nanopartículas de PLA, PLA-PEG e PLA-P80 em solução salina de tampão fosfato (50 mM, pH 7,4) adicionado de 1% de PVA

Formulação	Modelo de zero ordem		Modelo de primeira ordem		Modelo de Higuchi		Korsmeyer-Peppas
	R ²	k(h ⁻¹)	R ²	k (h ⁻¹)	R ²	k (h ⁻¹)	N
PLA	0,7507	0,388	0,7718	0,004	0,9307	0,235	0.581
PLA-PEG	0,727	0,660	0,7608	0,009	0,9163	0,400	0.540
PLA-P80	0,720	0,704	0,758	0,010	0,9122	0,427	0,575

A liberação do fármaco é influenciada por vários fatores (solubilidade do mesmo e do polímero, afinidade fármaco-polímero, da degradação do polímero, do tamanho das nanopartículas e da carga do fármaco). Assim, os mecanismos de liberação do fármaco podem ser modificados pelo tipo de polímero (KHALIL et al, 2013). Neste estudo, o tamanho médio da partícula e a eficiência de encapsulação de RVT foram semelhantes para as três formulações de nanopartículas e, por isso, pode-se afirmar que as diferenças na taxa de liberação das nanopartículas é devido à presença de PEG ou de P80, já que eles têm um caráter hidrofílico e podem melhorar a permeação de água e a difusão do fármaco através da matriz polimérica (MAINARDES, KHALIL e GREMIÃO, 2010; KHALIL et al, 2013, MAINARDES & GREMIÃO, 2012). Os resultados mostram que as nanopartículas de PLA-PEG e PLA-P80 liberaram mais RVT que as nanopartículas de PLA (cerca de 1,6 vezes, $p < 0,05$) durante todo o período analisado.

4.5 Aplicabilidade das nanopartículas poliméricas contendo resveratrol

4.5.1 Estudo do potencial antioxidante

Qualquer substância que, quando presente em baixas concentrações, em comparação as concentrações de um substrato oxidável, minimiza ou inibe de maneira significativa sua oxidação, propiciando assim, a diminuição da produção de radicais livres ou as suas ações, pode ser definida como uma substância antioxidante (APAK et al, 2007; DEVASAGAYAM et al, 2004). A importância dessas substâncias está ligada principalmente ao fato de que, os radicais livres de oxigênio que surgem, decorrentes do ciclo respiratório, podem atacar macromoléculas biológicas como o DNA celular, dando origem a danos que, eventualmente, podem causar o envelhecimento celular, doenças cardiovasculares, alterações mutagênicas, neurológicas e o crescimento de tumores cancerosos (APAK et al, 2007). O consumo de alimentos naturais apresentando atividade antioxidante é uma das maneiras mais eficientes de combater tais transformações indesejadas e prevenir riscos à saúde.

Os métodos mais comumente utilizados para determinar a capacidade antioxidante total de uma substância diferem em termos de seus princípios e condições experimentais, podendo ser divididos em dois grandes grupos: os ensaios com base em uma reação de transferência de elétron, normalmente monitorados através de uma mudança na coloração a partir da redução do oxidante, e ensaios com base na reação de transferência de átomos de hidrogênio, em que o antioxidante e o substrato atuam em competição pelos radicais livres (HUANG, OU & PRIOR, 2005).

O método que se utiliza do radical $ABTS^{*+}$ está incluído entre os procedimentos que realizam reações de transferência de elétrons. Neste trabalho, este método foi escolhido por ser rápido, ter alta simplicidade operacional, reprodutibilidade, flexibilidade à utilização de meios aquosos ou orgânicos, além da possível análise em uma ampla gama de valores de pH (LUCAS-ABELLÁN et al, 2011, AWIKA et al, 2003, APAK et al, 2007).

As nanopartículas contendo RVT foram avaliadas quanto à capacidade sequestrante do radical $ABTS^{*+}$. Os resultados obtidos a partir das concentrações de 1, 5, 10, 20 e 25 μM de RVT, livre ou encapsulado, nas três diferentes formulações de nanopartículas, foram avaliados nos tempos 0, 24, 48 e 72 h e estão apresentados na

Tabela 19 (dados analisados com teste ANOVA seguido de pós-teste de Tukey, com α de 0,05).

Os resultados obtidos com as nanopartículas mostram um perfil de inibição tempo-dependente e concentração-dependente. Já para o RVT livre não se observa o perfil tempo-dependente, pois em 0 h na máxima concentração já se observou o máximo percentual de inibição. Em 0 e 24 h, observa-se que as nanopartículas compostas por PLA e PLA-PEG apresentam a mesma capacidade sequestrante do ABTS^{•+} em todas as concentrações testadas ($p > 0,05$), exceto na de 25 μM , em que as de PLA-PEG foram mais efetivas ($p < 0,05$). Já as nanopartículas de PLA-P80, em 0 h, apresentaram menores valores de inibição, em todas as concentrações testadas ($p < 0,05$). Em 24 h, as nanopartículas de PLA-P80 começam a iguarrar-se com as demais, exceto na concentração de 20 μM . Em 48 h, pode-se observar que o RVT em nanopartículas de PLA-PEG foi mais eficaz do que aquele carregado em nanopartículas de PLA e nanopartículas de PLA-P80 ($p < 0,05$), que demonstraram perfil semelhante ($p > 0,05$). O RVT livre apresentou ainda maior capacidade sequestrante sobre o radical ($p < 0,05$), exceto na concentração de 25 μM , em que a inibição foi semelhante à do RVT nas partículas de PLA-PEG. Em 72 h, na concentração de 1 μM do fármaco, foi observado que as formulações de nanopartículas de PLA e PLA-PEG apresentaram eficácia semelhante ($p > 0,05$), e ambas superiores ao RVT livre ($p < 0,05$). A nanopartícula de PLA-P80 nessa concentração de ativo demonstrou potencial semelhante ao do RVT livre. Na concentração de 5 μM , o RVT liberado das nanopartículas de PLA teve sua ação mantida, mas o RVT livre e o RVT presente na formulação de PLA-PEG tiveram sua resposta aumentada, apresentando inclusive atividade sequestrante semelhante ($p > 0,05$). Em 25 mM, pode ser observado que o RVT presente nas nanopartículas de PLA-PEG e nanopartículas de PLA-P80 tiveram a mesma resposta que o RVT livre ($p > 0,05$), mas a resposta obtida com as nanopartículas de PLA carregadas com RVT foi inferior ($p < 0,05$).

Tabela 19 – Porcentagem de inibição do radical ABTS^{•+} por nanopartículas de PLA, PLA-PEG e PLA-P80 em concentrações de 1, 5, 10, 20, 25 µM em 0, 24, 48 e 72 horas

	Nanopartículas de PLA	Nanopartículas de PLA-PEG	Nanopartículas de PLA-P80	RVT livre
0 hora				
1µM	6,843 (±1,036) ^a	8,953 (± 1,701) ^a	1,11 (± 1,168) ^b	13,29 (± 1,25) ^c
5 µM	28,556 (±9,272) ^{a, b, c}	15,38 (± 0,763) ^{b, d}	10,866 (±11,855) ^{c, d}	46,333 (± 2,660) ^a
10 µM	35,496 (±1,584) ^a	33,23 (± 5,178) ^a	11,616 (± 1,603) ^b	69,213 (± 1,585) ^c
20 µM	53,346 (± 3,888) ^a	56,403 (± 2,630) ^a	22,68 (± 7,243) ^b	95,48 (± 4,610) ^c
25 µM	65,543 (± 7,299) ^a	64 (± 5,421) ^a	29,436 (± 1,386) ^b	99,703 (± 0,288) ^c
24 horas				
1µM	5,673 (± 0,452) ^a	2,926 (± 2,797) ^a	5,705 (± 0,610) ^a	7,346 (± 2,272) ^a
5 µM	10,893 (± 0,585) ^a	14,966 (± 3,869) ^a	8,581 (± 0,717) ^a	28,68 (± 3,291) ^b
10 µM	22,746 (± 1,868) ^a	24,093 (± 1,568) ^a	17,436 (± 6,196) ^a	49,353 (± 5,105) ^b
20 µM	50,493 (± 4,168) ^a	55,663 (± 1,651) ^a	35,373 (± 1,892) ^b	95,46 (± 5,205) ^c
25 µM	65,75 (± 3,141) ^a	75,873 (± 5,864) ^b	58,436 (± 1,241) ^a	97,883 (± 1,912) ^c
48 horas				
1µM	2,903 (± 2,335) ^{a, c, d}	7,496 (± 0,952) ^b	5,593 (± 0,879) ^{b, c, d}	2,216 (± 1,985) ^d
5 µM	7,866 (± 1,070) ^a	21,76 (± 2,174) ^a	9,896 (± 0,671) ^a	25,466 (± 12,527) ^a
10 µM	20,823 (± 2,305) ^a	35,01 (± 4,686) ^b	21,38 (± 1,525) ^a	47,736 (± 4,558) ^c
20 µM	45,76 (± 5,920) ^a	62,14 (± 3,201) ^b	50,836 (± 1,481) ^a	88,406 (± 0,880) ^c
25 µM	69,07 (± 12,225) ^a	85,133 (± 2,522) ^{a, b}	71,973 (± 6,635) ^a	98,336 (± 0,682) ^b
72 horas				
1µM	12,13 (± 0,652) ^a	14,013 (± 1,069) ^a	1,548 (± 0,935) ^b	3,833 (± 0,760) ^b
5 µM	13,3 (± 2,192) ^a	25,216 (± 1,666) ^b	12,37 (± 1,413) ^a	28,3 (± 1,961) ^b
10 µM	24,896 (± 4,455) ^a	40,58 (± 4,298) ^b	23,086 (± 3,888) ^a	51,43 (± 3,247) ^c
20 µM	57,263 (± 13,784) ^a	70,453 (± 2,386) ^b	54,288 (± 3,805) ^{a, b}	92,173 (± 4,861) ^c
25 µM	76,433 (± 2,489) ^a	90,99 (± 3,447) ^{b, d}	86,063 (± 6,925) ^{a, d}	95,523 (± 1,580) ^{c, d}

^{a, b, c, d} médias de triplicada ± desvio padrão analisadas por linha, onde letras iguais significam igualdade estatística e letras diferentes desigualdade estatísticas (ANOVA com pós teste Tukey e α 0,05).

O IC₅₀ do RVT livre e nanoencapsulado foi obtido e os resultados estão descritos na Tabela 20. O RVT livre apresentou um leve aumento no IC₅₀ com o tempo. Os valores de IC₅₀ obtidos com o RVT em nanopartículas de PLA apresentaram poucas variações ao longo do tempo, e foram superiores aos obtidos com o RVT livre ($p < 0,05$). Os valores obtidos com RVT a partir de nanopartículas de PLA-PEG e PLA-P80

foram diminuindo com o tempo, e em 48 e 72 h, os resultados obtidos com formulações de PLA-PEG foram considerados similares ao RVT livre ($p > 0,05$).

Tabela 20 - IC_{50} referente às nanopartículas investigadas sobre a captura do radical $ABTS^{\bullet+}$ em tampão fosfato de sódio 10 mM, pH 7,4, na ausência de luz e à temperatura ambiente $\lambda = 734\text{nm}$.

Tempo (h)	IC_{50} (μM) (média \pm RSD)			
	RVT em nanopartículas de PLA	RVT em nanopartículas de PLA-PEG	RVT em nanopartículas de PLA-P80	RVT livre
0	17,298 \pm 0,710 ^a	18,151 \pm 0,952 ^a	38,912 \pm 6,33 ^b	8,211 \pm 0,409 ^c
24	19,516 \pm 1,084 ^a	17,308 \pm 0,698 ^b	23,194 \pm 0,503 ^c	10,791 \pm 0,283 ^d
48	19,827 \pm 2,481 ^a	14,651 \pm 0,106 ^b	18,566 \pm 1,153 ^a	11,579 \pm 0,781 ^b
72	16,612 \pm 1,085 ^a	12,761 \pm 0,792 ^b	16,427 \pm 0,931 ^a	11,148 \pm 0,344 ^b

^{a, b, c, d} médias de triplicada \pm desvio padrão analisadas por linha, onde letras iguais significam semelhança estatística e letras diferentes desigualdade estatísticas (ANOVA com pós-teste de Tukey e $\alpha < 0,05$).

4.5.2 Avaliação dos efeitos neuroprotetores das nanopartículas de PLA-P80 carregadas com RVT em um modelo experimental de Doença de Parkinson

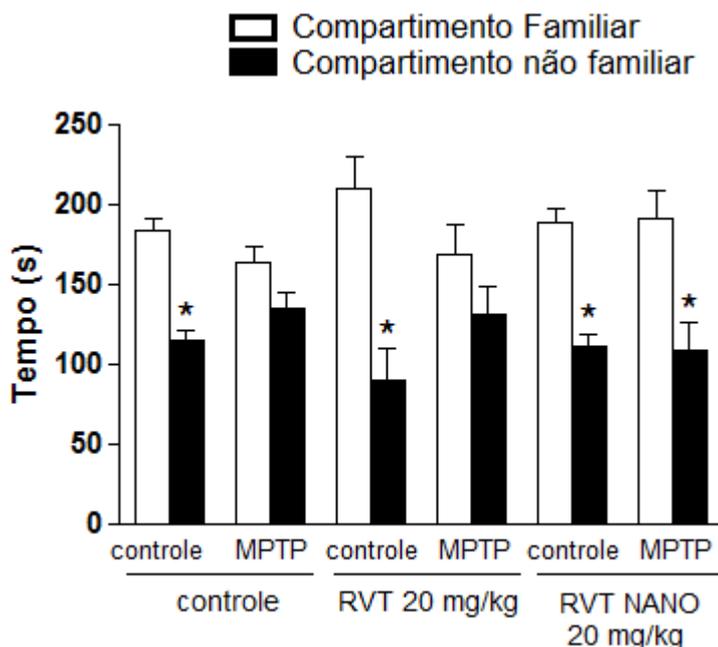
4.5.2.1 Análises comportamentais

A terapia dopaminérgica na Doença de Parkinson baseia-se na importância da perda de células dopaminérgicas nigroestriatais, seguida da depleção de dopamina, e aparecimento de sintomas motores (PREDIGER et al, 2011). No entanto, adicionalmente a perda dopaminérgica, outros campos neurais e sistemas neurotransmissores também estão envolvidos na doença de Parkinson, entre eles, estruturas olfativas anteriores, núcleo motor dorsal do vago, *locus coeruleus*, sistema nervoso autônomo, hipocampo e córtex cerebral (BRAAK et al, 2004). Assim, os outros tipos neurônais também sofrem risco de serem perdidos, gerando deficiências olfativas e de memória, alterações do sono, ansiedade, depressão e perturbação gastrointestinal, contribuindo para a incapacidade grave do paciente e perda da qualidade de vida (CHAUDHURI et al, 2006).

Em contraste com os sintomas dopaminérgicos da doença, os sintomas não motores são frequentemente mal reconhecidos e tratados de forma inadequada. Inevitavelmente, o desenvolvimento de tratamentos que podem retardar ou impedir a progressão da doença de Parkinson e da sua neurodegeneração multicêntrica oferece esperança de cura dos sintomas não motores (CHAUDHURI et al, 2006).

O dano olfatório é um dos sinais mais prevalentes na PD, ocorrendo em 70 a 90% dos casos, embora apenas 28% dos pacientes relatem essa queixa. Observam-se alterações de discriminação, identificação e limiar olfatório. As alterações olfatórias tem alta prevalência na fase pré-sintomática da DP e não se modificam com as medicações antiparkinsonianas (QUAGLIATO et al, 2007). Os resultados relacionados aos efeitos da administração intraperitoneal repetida (i.p.) de RVT (20 mg/kg, uma vez ao dia durante 15 dias) em camundongos adultos C57BL/6 no teste de discriminação olfatória é dado na Figura 25.

Figura 25 - Efeitos do tratamento com RVT livre e nanoparticulado (20 mg/kg/dia durante 15 dias) na capacidade de discriminação olfatória de camundongos C57BL/6 que receberam MPTP (i.n., 1 mg/narina).



Um teste *t de Student* para amostras pareadas foi realizado à cada grupo, e esse teste revelou que os camundongos do grupo controle (animais que receberam somente salina i.p. e i.n.) foram capazes de discriminar entre os compartimentos familiar e não familiar, permanecendo muito mais tempo no compartimento familiar. No entanto,

aqueles tratados com a neurotoxina MPTP não foram capazes de discriminar os compartimentos, gastando tempo semelhante em cada um, com exceção daqueles tratado com nanopartículas de PLA-P80 carregadas com RVT. Neste grupo, mesmo os animais recebendo a neurotoxina, não foi detectado perda da capacidade de discriminação olfatória, já que o tempo gasto no compartimento familiar foi significativamente maior do que o tempo gasto no não familiar.

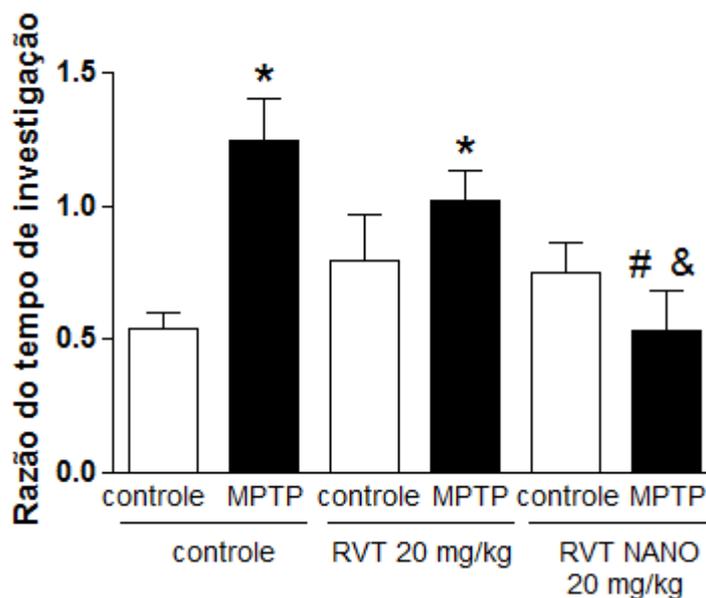
Em resumo, pode-se dizer que o MPTP (i.n, 1 mg/narina) gerou dano olfatório nos animais, e o RVT livre não conseguiu conter essa alteração, sendo que os animais acabaram permanecendo tempo semelhantes nos dois compartimentos. Ao contrário, o grupo de animais tratados com RVT presente em nanopartículas de PLA-P80 mostrou o equilíbrio olfatório nos animais, sendo que eles conseguiram distinguir melhor os compartimentos, resultando em maiores tempo de permanência no local familiar.

Sabe-se que, camundongos machos adultos gastam uma grande quantidade de tempo no reconhecimento de camundongos jovens. Em contraste, os camundongos expostos novamente ao mesmo jovem após um curto período de tempo (máximo 45 min) apresentam uma diminuição no tempo no comportamento exploratório. Entretanto, se a re-exposição ocorrer após um período maior (aproximadamente 1-2 horas), o jovem é novamente investigado como da primeira vez. Sendo assim, pode-se afirmar que os camundongos formam uma memória temporária para um jovem em particular (DANTZER et al, 1987).

Os resultados do teste de capacidade de reconhecimento social dos camundongos C57BL/6 estão resumidos na figura 26, os dados estão disposto em forma de razão entre o tempo gasto no reconhecimento na reexposição sobre o tempo gasto no reconhecimento social na primeira exposição do animal jovem. A análise dos dados coletados revelou um efeito significativo sobre o aumento no tempo de investigação de um camundongo jovem após uma reexposição do animal em curto período de tempo, para os animais que foram tratados com MPTP ($1,24 \pm 0,42$) comparados ao grupo controle ($0,54 \pm 0,12$). O grupo de animais que recebeu pré-tratamento com RVT livre e posteriormente o MPTP ($1,02 \pm 0,26$), demonstraram um comportamento semelhante ao dos animais que receberam somente MPTP. Neste caso o fármaco administrado aos animais (20 mg/kg/dia i.p. durante 15 dias) não conseguiu alterar as modificações causadas pelo MPTP. De forma contrária, o grupo de animais que recebeu o pré-

tratamento com RVT carregado por nanopartículas de PLA-P80 juntamente com o MPTP ($0,533 \pm 0,40$) foram semelhantes aos dados do grupo controle.

Figura 26 - Efeitos do tratamento (durante 15 dias consecutivos) com controle, RVT ou nanopartículas de PLA-P80 carregadas com RVT (20 mg/kg, i.p.) na memória de reconhecimento social de camundongos C57BL/6, 7 dias depois de infusão de MPTP (1 mg / narina).



* $p \leq 0,05$ comparado ao grupo controle; # $p \leq 0,05$ comparado ao grupo controle+MPTP; & $p \leq 0,05$ comparado ao grupo RVT livre + MPTP.

4.5.2.3 Estimativa da peroxidação lipídica - TBARS

Na PD, a causa da perda neuronal não está elucidada, porém, há evidências crescentes do papel do dano oxidativo nesse processo. Os radicais livres reagem instantaneamente com lipídios de membrana e causam peroxidação lipídica e morte celular. Portanto, a peroxidação lipídica tem sido identificada como uma reação básica de deterioração nos mecanismos celulares do processo de envelhecimento, lesão celular por poluentes ambientais e em doenças neurodegenerativas (SHARMA et al, 2008).

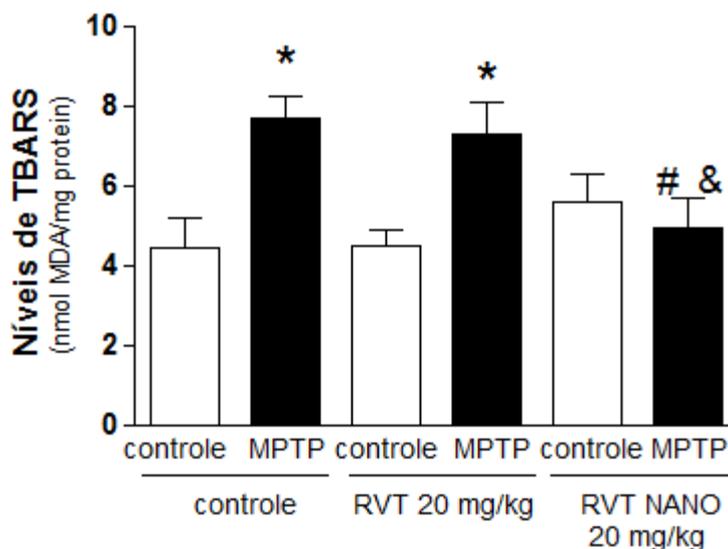
Os níveis de TBARS foram medidos para demonstrar a extensão do dano oxidativo aos lipídios e a proteção contra esse processo originada pelo tratamento com RVT livre e RVT associado à nanopartículas de PLA-P80 (figura 27). Foi encontrado um aumento significativo ($p \leq 0,05$) do conteúdo de TBARS 8 dias após a administração intranasal do MPTP ($7,69 \pm 1,33$ nmol MDA/mg proteína), quando

comparado ao grupo controle ($4,47 \pm 1,9$ nmol MDA/mg proteína). Esse resultado é consistente com outros trabalhos já publicados (DEXTER et al, 1989; KHAN et al, 2013).

O tratamento com nanopartículas de PLA-P80 carregadas com RVT na dose de 20 mg/kg + MPTP, o RVT nanoparticulado preveniu significativamente o aumento nos níveis de TBARS ($p \leq 0,05$, $4,94 \pm 2,0$ nmol MDA/mg proteína) quando em comparação com os outros grupos tratados com MPTP. O mesmo não foi observado com o grupo que recebeu a administração do RVT livre + MPTP, para o qual os resultados obtidos não diferiram significativamente daqueles encontrados no grupo controle+MPTP ($p > 0,05$, média de $7,31 \pm 1,98$ nmol MDA/mg proteína).

Em resumo, neste estudo, o RVT livre não foi capaz de prevenir o aumento da peroxidação lipídica no estriado de camundongos tratados com MPTP. Entretanto, o RVT encapsulado nas nanopartículas propostas conseguiu prevenir o aumento da peroxidação lipídica significativamente, levando a sugerir que as nanopartículas obtiveram sucesso no carreamento do fármaco pela BHE e uma maior disponibilidade que o RVT livre, administrado na mesma dose.

Figura 27 - Efeitos do RVT livre, nanopartículas de PLA-P80 contendo RVT e do MPTP nos níveis de peroxidação lipídica no estriado de camundongos C57BL/6



* $p \leq 0,05$ quando comparado ao grupo controle+controle; # $p \leq 0,05$ quando comparado ao grupo controle+MPTP; & $p \leq 0,05$ quando comparado ao grupo RVT livre + MPTP

4.5.2.4 Tirosina hidroxilase - TH

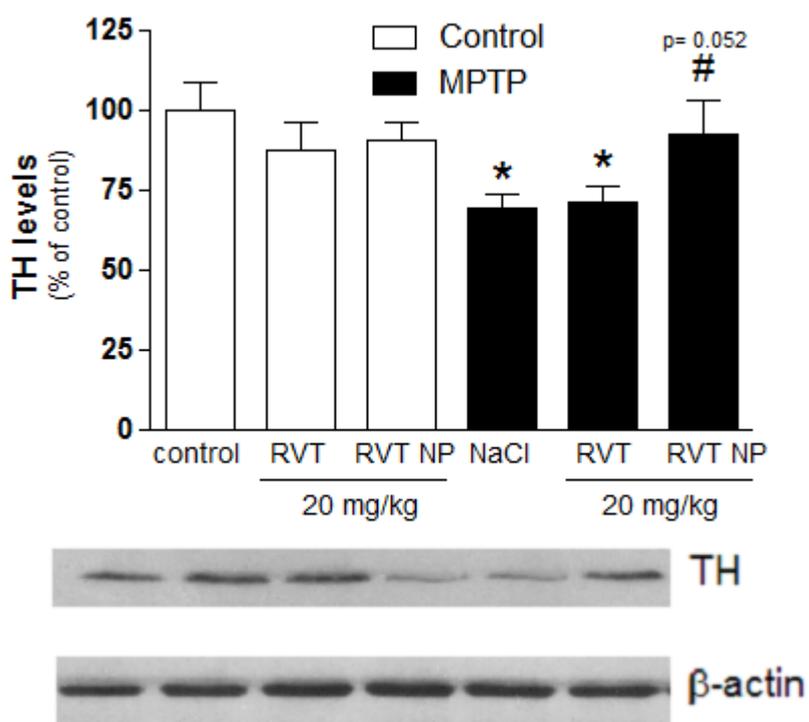
Os mecanismos responsáveis pela perda de células dopaminérgicas nigro-estriatais ainda são obscuros (ABOU-SLEIMAN et al, 2006; SRIVASTAVA et al, 2012). No entanto, sabe-se pontualmente que os marcadores neuroquímicos específicos para a doença incluem uma profunda redução nos títulos de dopamina, bem como os níveis de TH (HEIKKILA & SONSALLA, 1992). A TH é um enzima limitante da velocidade de síntese de dopamina e está presente nos neurônios dopaminérgicos na área nigroestriatal. Assim, as células TH-positivas representam neurônios dopaminérgicos nesta área (RIBEIRO et al, 2013).

Em nosso estudo, os ensaios de Western Blot foram realizados no estriado dos camundongos, afim de investigar os níveis da proteína TH em camundongos tratados com MPTP e/ou tratados com RVT livre ou presente nas nanopartículas de PLA-P80 (figura 28). Os resultados obtidos a partir dos camundongos que receberam o MPTP ($69,39 \pm 10,16\%$) revelaram uma diferença significativa ($p \leq 0,05$) do grupo controle ($100,0 \pm 19,72\%$), comprovando a ação tóxica do MPTP. Já o grupo que recebeu concomitantemente o RVT livre e o MPTP não mostrou diferença quando comparado ao grupo MPTP e foi diferente do grupo controle. Sendo assim, o composto livre não possuiu capacidade de agir de forma protetora contra a perda da reatividade nos níveis da proteína. Ao contrário do presente resultado, Blanchet e colaboradores (2008) relataram que a administração de uma dieta contendo RVT livre (50 mg/kg/dia) em camundongos adultos, uma semana antes do tratamento agudo com a toxina dopaminérgica MPTP, foi protetor na perda dos níveis de dopamina e da TH estriatal, mantendo níveis próximos ao do grupo controle.

Por outro lado, os resultados referentes ao grupo que recebeu MPTP + nanopartículas de PLA-P80 carregados com RVT ($92,83 \pm 22,86\%$) mostraram os níveis de reatividade da TH similares ao controle e diferentes do grupo de animais tratados somente com MPTP ($92,83 \pm 22,86\%$). Isso sugere que o RVT nanoparticulado pode apresentar uma maior passagem pela BHE ou ainda uma maior disponibilidade ao SNC, observada pelo efeito neuroprotetor do RVT já confirmada em outros trabalhos (OKAWARA et al, 2007; KHAN et al, 2010; SRIVASTAVA et al, 2012). Resultados semelhantes a este estudo já foram encontrados por Wang e colaboradores (2011) que obtiveram um aumento no número de células TH-positivas após o tratamento com uma

formulação lipossomal de RVT (20 mg/kg por dia) durante duas semanas, mesmo tempo de tratamento que foi empregado nesta investigação.

Figura 28 - Análise por Western blot nos níveis da proteína Tirosina hidroxilase (TH) no estriado de camundongos machos C57BL/6 tratados com RVT, RVT em nanopartículas de PLA-P80 e/ou MPTP



* $p \leq 0,05$ comparado ao grupo controle; # $p \leq 0,05$ comparado ao grupo MPTP.

5. CONCLUSÕES

- Foi desenvolvido e validado um método analítico por HPLC com detecção PDA com características de especificidade, sensibilidade, linearidade, precisão, exatidão e robustez útil para quantificação de RVT em nanopartículas de PLA, PLA-P80 e PLA-PEG.

- Nanopartículas de PLA contendo RVT, com ou sem modificação superficial por PEG ou P80, foram produzidas com sucesso por meio do método de simples emulsificação-evaporação do solvente.

- O delineamento fatorial permitiu com facilidade, baixo custo e agilidade a otimização da formulação de nanopartículas, e, assim, estabelecer a composição ótima que resultou em partículas com diâmetros reduzidos e elevados valores de eficiência de encapsulação do fármaco.

- A caracterização físico-química demonstrou que esse método permitiu encapsular elevados teores de fármaco, que as nanopartículas desenvolvidas apresentaram reduzido diâmetro médio, baixo índice de polidispersividade, potencial zeta negativo e distante da neutralidade, além de caráter amorfo e característica de liberação prolongada do fármaco.

- As nanopartículas de PLA, PLA-PEG e PLA-P80 contendo RVT foram avaliadas quanto à capacidade sequestrante do radical ABTS^{•+} e os resultados obtidos com as nanopartículas mostram um perfil de inibição tempo e concentração-dependente.

- Quando encapsulado nas nanopartículas PLA-P80, o RVT demonstrou diminuir os níveis de TBARS e aumentar significativamente os níveis teciduais de TH no tecido estriatal de camundongos C57BL/6, o mesmo não foi conseguido com a administração do fármaco livre.

- A análise comportamental dos animais tratados com nanopartículas de PLA-P80 contendo RVT analisados pelos testes de reconhecimento social e capacidade de discriminação olfatória demonstrou que os parâmetros de memória e olfato dos animais não foram prejudicados com a administração de MPTP intranasal, pois mantiveram perfil semelhante daqueles do grupo controle.

- Até o momento, o conjunto de resultados demonstra que os sistemas carreadores de fármaco produzidos com PLA, PLA-PEG e PLA-P80 possuem adequadas características físico-químicas e são capazes de manter a atividade

antioxidante do RVT. E, em adição, as nanopartículas de PLA-P80 demonstraram potencializar a ação neuroprotetora relacionada ao RVT.

REFERÊNCIAS

- ABBOTT, A. Dementia: A problem for our age. **Nature**, v. 475, n. 7355, p. S2-S4, 2011.
- ABOU-SLEIMAN, P. M.; MUQIT, M. M. K.; WOOD, N. W. Expanding insights of mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. **Nature Reviews – Neuroscience**, v. 7, p. 207-219, 2006.
- AHLIN, P.; KRISTL, J.; KRISTL, A.; VRECER, F. Investigation of polymeric nanoparticles as carriers of enalaprilat for oral administration. **Internation Journal of Pharmaceutics**, v. 239, p. 113–120, 2002.
- ALAM, M. I.; BEG, S.; SAMAD, A.; BABOOTA, S.; KOHLI, K.; ALI, J.; AHUJA, A.; AKBAR, M. Strategy for effective brain drug delivery. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 40, p. 385–403, 2010.
- ALLEN, T. M. The use of glycolipids and hydrophilic polymers in avoiding rapid uptake of liposomes by the mononuclear phagocyte systems. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 13, p. 285-309, 1994.
- ALONSO, M. J. Nanomedicine for overcoming biological barriers. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 58, n. 3, p. 168-172, 2004.
- ALVIRA, D.; YESTE-VELASCO, M.; FOLCH, J.; VERDAGUER, E.; CANUDAS, A. M.; PALLÀS, M.; CAMINS, A. Comparative analysis of the effects of resveratrol in two apoptotic models: inhibition of complex i and potassium deprivation in cerebellar neurons. **Neuroscience**, v. 147, p. 746–756, 2007.
- AMELLER, T.; MARSAUD, V.; LEGRAND, P.; GREF, R.; RENOIR, J.M. *In vitro* and *in vivo* biologic evaluation of long-circulating biodegradable drug carriers loaded with the pure antiestrogen RU 58668. **Internacional Journal of Cancer**, v. 106, p. 446-54, 2003.

AMRI, A.; CHAUMEIL, J. C.; SFAR, S.; CHARRUEAU, C. Administration of resveratrol: What formulation solutions to bioavailability limitations? **Journal of Controlled Release**, v. 158, p. 182–193, 2012.

ANEKONDA, T.S. Resveratrol—A boon for treating Alzheimer's disease? **Brain Research reviews**, v. 52, p. 316-326, 2006.

ANSARI, K. A.; VAVIA, P. R.; TROTTA, F.; CAVALLI, R. Cyclodextrin-based nanosponges for delivery of resveratrol: in vitro characterisation, stability, cytotoxicity and permeation study. **AAPS PharmSciTech**, v. 12, p. 279–286, 2011.

ANVISA - AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução RE 899 de 29 de maio de 2003. Determina a publicação do guia para a validação de métodos analíticos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**. Brasília: 02 de julho de 2003.

APAK, R.; GÜÇLÜ, K.; DEMIRATA, B.; ÖZYÜREK, M.; ÇELİK, S. E.; BEKTAPOOLU, B.; BERKER, K. I.; OZYURT, D. Comparative evaluation of various total antioxidant capacity assays applied to phenolic compounds with the CUPRAC Assay. **Molecules**, v. 12, p. 1496-1547, 2007.

ASTETE, C.; KUMAR, C.; SABLIOV C. M. Size control of poly(D,L-Lactide-co-Glycolide) and poly(D,L-Lactide-co-Glycolide)-magnetite nanoparticles synthesized by emulsion evaporation technique. **Journal of Colloids and Surfaces A**, v. 299, p. 209–216, 2007.

AVADI, M. R.; SADEGHI, A. M. M.; MOHAMMADPOUR, N.; ABEDIN, S.; ATYABI, F.; DINARVAND, R.; RAFIEE-TEHRANI, M. Preparation and characterization of insulin nanoparticles using chitosan and Arabic gum with ionic gelation method. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 6, p. 58–63, 2010.

AWIKA, J. M.; ROONEY, L. W.; WU, X.; PRIOR, R. L.; CISNEROS-ZEVALLOS, L. Screening Methods to Measure Antioxidant Activity of Sorghum (*Sorghum bicolor*) and

Sorghum Products. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 6657-6662, 2003.

BANGHAM, A. D. Liposomes. Ed. Marcel Dekker, New York, 1 ed, p.1-26, 1983.

BANZATTO, D. A.; KRONKA, S. N. **Experimentação agrícola**. Jaboticabal, FUNEP, 127-174, 1989.

BARWAL, I.; SOOD, A.; SHARMA, M.; SINGH, B.; YADAV, S. C. Development of stevioside Pluronic-F-68 copolymer based PLA-nanoparticles as an antidiabetic nanomedicine. **Colloids Surfaces B Biointerfaces**, v.101, p. 510-516, 2013.

BAUR, A. J.; SINCLAIR, D. A. Therapeutic potential of resveratrol: the in vivo evidence. **Nature Reviews**, v. 500, p. 493–506, 2006.

BECK-BROICHSITTER, M.; SCHMEHL, T.; GESSLER, T.; SEEGER, W.; KISSEL, T.; Development of a biodegradable nanoparticle platform for sildenafil: Formulation optimization by factorial design analysis combined with application of charge-modified branched polyesters. **Journal of Controlled Release**, v. 157, p. 469–477, 2012.

BE'DUNEAUA, A.; SAULNIERA, P; BENOIT, J.P. Active targeting of brain tumors using nanocarriers. **Biomaterials**, v. 28, p. 4947–4967, 2007.

BEGLEY, D. J. Delivery of therapeutic agents to the central nervous system: the problems and the possibilities. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 104, p. 29–45, 2004.

BERTELLI, A. A. E.; GIOVANNINI, L.; GIANNES, D.; MIGLIORI, M.; BERNINI, W.; FREGONI, M.; BERTELLI, A. Antiplatelet activity of cis-resveratrol. **International Journal of Tissue Reactions**, v. 17, p. 61-63, 1995.

BERTELLI, A. A.; GIOVANNINI, L.; STRADI, R.; URIEN, S.; TILLEMENT, J. P.; Kinetics of trans- and cis-resveratrol (3,4',5-trihydroxystilbene) after red wine oral administration in rats. **International Journal of Clinical Pharmacology research**, v. 16, p. 77–81, 1996.

BHAVSAR, M. D.; TIWARI, S. B.; AMIJI, M. M. Formulation optimization for the nanoparticles in microsphere hybrid oral delivery system using factorial design. **Journal of Controlled Release**, v. 110, p. 422 – 430, 2006.

BIANCO, A.; COSTARELOS, K.; PRATO, M. Applications of carbon nanotubes in drug delivery. **Current Opinion in Chemical Biology**, n. 9, p. 674-679, 2005.

BILLES, F.; MOHAMMED-ZIEGLER, I.; MIKOSCH, H.; TYIHÁK, E. Vibrational spectroscopy of resveratrol. **Spectrochimica Acta Part A**, n. 68, p. 669–679, 2007.

BLANCHET, J.; LONGPRÉ, F.; BUREAU, G.; MORISSETTE, M.; DIPAOLO, T.; BRONCHTI, G.; MARTINOLI, M.G. Resveratrol, a red wine polyphenol, protects dopaminergic neurons in MPTP-treated mice. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 32, p. 1243–1250, 2008.

BOBO, R. H., DOUGLAS, W., AKBASAK, A., MORRISON, P. F., DEDRICK, R. L., OLDFIELD, E. H. Convection-enhanced delivery of macromolecules in the brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, n. 91, p. 2076–2080, 1994.

BORCHARD, G.; AUDUS, K.L.; SHI, F.; KREUTER, J. Uptake of surfactant-coated poly(methyl methacrylate)-nanoparticles by bovine brain microvessel endothelial cell monolayers. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 110, p. 29 – 35, 1994.

BORLONGAN, C. V.; EMERICH, D. F. Facilitation of drug entry into the CNS via transient permeation of blood–brain barrier: laboratory and preliminary clinical evidence from bradykinin receptor agonist, Cereport. **Brain Research Bulletin**, v. 60, p. 297-306, 2003.

BRAAK, H.; GHEBREMEDHIN, E.; RUB, U.; BRATZKE, H.; DEL TREDICI, K. Stages in the development of Parkinson's disease-related pathology. **Cell and Tissue Research**, v. 318, p. 121-34, 2004.

BRADLEY, M. O.; WEBB, N. L.; ANTHONY, F. H.; DEVANESAN, P.; WITMAN, P. A.; HEMAMALINI, S.; CHANDER, M. C.; BAKER, S. D.; HE, L.; HORWITZ, S.B.; SWINDELL, C.S. Tumor targeting by covalent conjugation of a natural fatty acid to paclitaxel. **Clinical Cancer Research**, v. 7, p. 3229–3238, 2001.

Brain Tumor Facts. American Brain Tumor Association, Disponível em: <www.abta.org/news/brain-tumor-fact-sheets>. Acesso em: 28/06/2013).

BRIGGER, I.; DUBERNET, C.; COUVREUR, P. Nanoparticles in câncer therapy and diagnosis. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 54, p. 631-651, 2002.

BURYANOVSKYY, L.; FU, Y.; BOYD, M.; MA, Y.; HSIEH, T. C.; WU, J.M.; ZHANG, Z.; Crystal structure of quinone reductase 2 in complex with resveratrol. **Biochemistry**, v. 43, p. 11417–11426, 2004.

CHAUDHURI, K. R.; HEALY, D. G.; SCHAPIRA, A. H. Non-motor symptoms of Parkinson's disease: diagnosis and management. **Lancet Neurology**, v. 5, p. 235-45, 2006.

CHAUHAN, N. B. Trafficking of intracerebroventricularly injected antisense oligonucleotides in the mouse brain. **Antisense and Nucleic Acid Drug Development**, v. 12, p. 353–357, 2002.

COATES, J. Interpretation of Infrared Spectra, A Practical Approach in *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, Ed. R.A. Meyers, p. 10815–10837, 2000.

COIMBRA, M.; ISACCHI, B.; VAN BLOOIS, L.; TORANO, J. S.; KET, A.; WU, X.; BROERE, F.; METSELAAR, J. M.; RIJCKEN, C. J. F.; STORM, G.; BILIA, R.; SCHIFFELERS, R. M. Improving solubility and chemical stability of natural compounds for medicinal use by incorporation into liposomes. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 416, p. 433 – 442, 2011.

COUVREUR, P.; BARRAT, G.; FATTAL, E.; LEGRAND, P.; VAUTHIER, C. Nanocapsule Technology: A review. **Critical review in therapeutic drug Carrier system**, v.19, p. 99-134, 2002.

COUVRER, P.; VAUTHIER, C. Nanotechnology: Intelligent Design to Treat Complex Disease. **Pharmaceutical Research**, v. 23, p. 1417 – 1450, 2006.

DANTZER, R.; BLUTHE, R. M.; KOOB, G. F.; LE MOAL, M. Modulation of social memory in male rats by neurohypophyseal peptides. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 91, p. 363-368, 1987.

DEVASAGAYAM, T. P.; TILAK, J. C.; BOLOOR, K. K.; SANE, K. S.; GHASKADBI, S. S.; LELE, R. D. Free radicals and antioxidants in human health: current status and future prospects. **Journal of the Association of Physicians of India**, v. 52, p. 794-804, 2004.

DEXTER, D. T.; WELLS, F. R.; LEES, A. J.; AGID, F.; AGID, Y.; JENNER, P.; MARSDEN, C. D. Increased nigral iron content and alterations in other metal ions occurring in brain in Parkinson's disease. **Journal of Neurochemistry**, v. 52, p. 1830–1836, 1989.

DHIRENDRA, K.; LEWIS, S.; UDUPA, N.; ATIN, K. Solid Dispersions: A Review. **Pakistan Journal of Pharmaceutical Science**, v.22, p. 234-246, 2009.

DLUZEN, D. E.; KEFALAS, G. The effects of intranasal infusion of 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine (MPTP) upon catecholamine concentrations within olfactory bulbs and corpus striatum of male mice. **Brain Research**, v. 741, p. 215–219, 1996.

DOCHERTY, J. J.; FU, M. M. H.; STIFFLER, B. S.; LIMPEROS, R. J.; POKABLA, C. M.; DELUCIA, A. L. Resveratrol inhibition of herpes simplex virus replication. **Antiviral Research**, v. 43, p. 145-155, 1999.

DUDLEY, J.; DAS, S.; MUKHERJEE, S.; DAS, D. K. Resveratrol, a unique phytoalexin present in red wine, delivers either survival signal or death signal to the ischemic myocardium depending on dose. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 20, p. 443-452, 2009.

DUPEYRÓN, D.; KAWAKAMI, M.; FERREIRA, A. M.; CÁCERES-VÉLEZ, P. R.; RIEUMONT, J.; AZEVEDO, R. B.; CARVALHO, J. C. T. Design of indomethacin-loaded nanoparticles: effect of polymer matrix and surfactant. **International Journal of Nanomedicine**, vol. 8, pp. 3467–3477, 2013.

FANG, J.; HUNG, C.F.; LIAO, M.H.; CHIEN, C.C. A study of the formulation design of acoustically active lipospheres as carriers for drug delivery. **Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 67, p. 67–75, 2007.

FANGUEIRO, J. F.; ANDREANI, T.; EGEEA, M. A.; GARCIA, M.L.; SOUTO, S. B.; SOUTO, E.B. Experimental Factorial Design Applied to Mucoadhesive Lipid Nanoparticles via Multiple Emulsion Process. **Colloids and Surfaces B: Biointerface**, v. 100, p. 84-89, 2012.

FERREIRA, A. G. Preparação, caracterização e avaliação da atividade in vitro antileucêmica de nanocápsulas de camptotecina convencionais e furtivas. Dissertação de Mestrado, 2007.

FILIP, V.; PLOCKOVA, M.; SMIDRKAL, J.; SPICKOVA, Z.; MELZUCH, K.; SCHMIDT, S. Resveratrol and its antioxidant and antimicrobial effectiveness. **Food Chemistry**, v. 83, p. 585-593, 2003.

FORTIN, D.; GENDRON, C.; BOUDRIAS, M.; GARANT, M.P. Enhanced chemotherapy delivery by intraarterial infusion and blood–brain barrier disruption in the treatment of cerebral metastasis. **Cancer**, v. 109, p. 751–760, 2007.

FRANKEL, E. N., WATERHOUSE, A. L.; KINSELLA, J. E. Inhibition of human LDL oxidation by resveratrol. **The Lancet**, v. 341, p. 1103–1104, 1993.

FREMONT, L., BELGUENDOZ, L.; DELPAL, S. Antioxidant activity of resveratrol and alcohol-free wine polyphenols related to LDL oxidation and polyunsaturated fatty acids. **Life Science**, v. 64, p. 2511–2521, 1999.

FREYTAG, T.; DASHEVSKY, A.; TILLMAN, L.; HARDEE, G. E.; BODMEIER, R.; Improvement of the encapsulation efficiency of oligonucleotide-containing biodegradable microspheres. **Journal of Controlled Release**, v. 69, p.197–207, 2000.

FROZZA, R. L.; BERNARDI, A.; PAESE, K.; HOPPE, J. B.; da SILVA, T.; BATTASTINI, A. M. O.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S.; SALBEGO, C. Characterization of *trans*-resveratrol-loaded lipid-core nanocapsules and tissue

distribution studies in rats. **Journal of Biomedical Nanotechnology** v. 6, n. 6, p. 694-703, 2010.

GABATHULER, R. Delivery of therapeutic agents to the central nervous system: the problems and the possibilities. **Neurobiology of Disease**, v. 37, p. 48–57, 2010.

GELPERINA, S.; KHALANSKY, A.S.; SKIDAN, I.N.; SMIRNOVA, Z.S.; BOBRUSKIN A.I.; SEVERIN, S.E.; TUROWSKI, B.; ZANELLA, F.E.; J. KREUTER. Toxicological studies of doxorubicin bound to polysorbate 80-coated poly(butyl cyanoacrylate) nanoparticles in healthy rats and rats with intracranial glioblastoma **Toxicology Letters**, v. 126, p. 131–141, 2002.

GELPERINA, S.; MAKSIMENKO, O.; KHALANSKY, A.; VANCHUGOVA, L.; SHIPULO, E.; ABBASOVA, K.; BERDIEV, R.; WOHLFART, S.; CHEPURNOVA, N.; KREUTER, J. Drug delivery to the brain using surfactant-coated poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles: Influence of the formulation parameters. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 74, p.157–163, 2010.

GREGORIADIS, G.; WILLS, E. J.; SWAIN, C. P.; TAVILL, A. S. Drug carrier potential of liposomes in cancer chemotherapy. **The Lancet**, v. 1, p. 1313-1316, 1974.

GUPTA, S.C.; KIM, J.H.; PRASAD, S.; AGGARWAL, B.B. Regulation of survival, proliferation, invasion, angiogenesis, and metastasis of tumor cells through modulation of inflammatory pathways by nutraceuticals. **Cancer Metastasis Reviews**, v. 29, n. 3, p. 405-434, 2010.

GUPTA, R. B.; KOMPELLA, U. B. Nanoparticles Technology for Drug Delivery. **Taylor & Francis Group**. New York, v. 159, 2006.

HABIB, S. M.; AYED, AMR, A. S.; HAMADNEH, I. M. Nanoencapsulation of Alpha-linolenic Acid with Modified Emulsion Diffusion Method. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 89, p. 695 – 703, 2012.

HARTZ, A.M.; BAUER, B. ABC transporters in the CNS - an inventory. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v. 12, p.656-73, 2011.

HAWKINS, B. T.; DAVIS, T. P. The blood-brain barrier/neurovascular unit in health and disease. **Pharmacological Reviews**, v. 57, n. 2, p.173-185, 2005.

HE, H., CHEN, X., WANG, G., WANG, J., DAVEY, A. K. High-performance liquid chromatography spectrometric analysis of *trans*-resveratrol in rat plasma. **Journal of Chromatography B**, v. 832, p. 177–180, 2006.

HEIKKILA, R. E.; SONSALLA, P. K. The MPTP-treated mouse as a model of Parkinsonism: How good is it? **Neurochemistry International**, v. 20, p. 299-303, 1992.

HENTON, D. E.; GRUBER, P.; LUNT, J.; RANDALL, J. Capítulo 16: Polylactic Acid Technology. Natural Fibers, Biopolymers, and Biocomposites. Boca Raton: CRC Press, 2005.

HERMANS, C.; PLAS, D. V.; EVERAERT, A.; WEYENBERG, W.; LUDWIG, A. Full factorial design, physicochemical characterisation and biological assessment of cyclosporine A loaded cationic nanoparticles. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v.82, p. 27-35, 2012.

HOLVOET, P. Oxidized LDL and coronary heart disease. **Acta Cardiologica**, v. 59, p. 479–484, 2004.

HOU, Z.; ZHOU, C.; LUO, Y.; ZHAN, C.; WANG, Y.; XIE, L.; ZHANG, Q. PLA nanoparticles loaded with an active lactone form of hydroxycamptothecin: Development, optimization, and in vitro–in vivo evaluation in mice bearing H22 solid tumor. **Drug Development Research**, v.72. p. 1098-2299, 2011.

HOWITZ, K. T.; BITTERMAN, K. J.; COHEN, H. Y.; LAMMING, D. W.; LAVU, S.; WOOD, J. G.; ZIPKIN, R. E.; CHUNG, P.; KISIELEWSKI, A.; ZHANG, L. L.; SCHERER, B.; SINCLAIR, D. A. Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan, **Nature**, v. 425, p. 191–196, 2003.

HU, M. Commentary: bioavailability of flavonoids and polyphenols: call to arms, **Molecular Pharmacology**, v. 6, p. 803–806, 2007.

HUANG, D.; OU, B.; PRIOR, R. L. The chemistry behind antioxidant capacity assays.

Journal of Agricultural and Food Chemistry, v.23, p.1841-56, 2005.

HUANG, L.S.; WANG, C.X.; CHEN, Z.L.; XU, Y.; WANG, Y.L.; ZHONG, Y.S.; LIU, Y. Study on targeting to the brain tissue of mice by Tween 80-coated gemcitabine polybutylcyanoacrylate nanoparticles. **Zhongguo Yiyuan Yaoxue Zazhi**, v. 28, n.16, p. 1332–1336, 2008.

ILLUM, L.; HUNNEYBALL, I. M.; DAVIS, S. S. The effect of hydrophilic coatings on the uptake of colloidal particles by the liver and by peritoneal macrophages, **International Journal of Pharmaceutics**, v. 29, p. 53-65, 1986.

INCA, Câncer no Brasil | Dados dos Registros de Base Populacional. 2012.

ICH – International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human use: **Q2B – validation of Analytical procedures: methodology**, 2005.

JAIN, S.; SARAF, S. Influence of processing variables and in vitro characterization of glipizide loaded biodegradable nanoparticles, **Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews**, v. 3, n. 2, p. 113-117, 2009.

JALIL, R.; NIXON, J. R. Microencapsulation using poly (L-lactic acid) II: Preparative variables affecting microcapsule properties Microencapsulation. **Journal of Microencapsulation**, v. 7, p. 25-39, 1990.

JIN, F., WU, Q., LU, Y. F., GONG, Q.H., SHI, J. S. Neuroprotective effect of resveratrol on 6-OHDA-induced Parkinson's disease in rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 600, p. 78–82, 2008.

KAYSER, O.; LEMKE, A.; HERNÁNDEZ-TREJO, N. The Impact of Nanobiotechnology on the Development of New Drug Delivery Systems. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v. 6, p. 3-5, 2005.

KANG, O. H.; JANG, H. J.; CHAE, H. S.; OH, Y. C.; CHOI, J. G.; LEE, Y. S.; KIM, J. H.; KIM, Y. C.; SOHN, D. H.; PARK, H.; KWON, D. Y. Anti-inflammatory

mechanisms of resveratrol in activated HMC-1 cells: pivotal roles of NF-kappaB and MAPK. **Pharmacological Research**, v. 59, p. 330-337, 2009.

KHALIL, N. M.; DO NASCIMENTO, T. C.; CASA, D. M.; DALMOLIN L. F.; DE MATTO, A. C.; HOSS, I.; ROMANO, M. A.; MAINARDES R. M. Pharmacokinetics of curcumin-loaded PLGA and PLGA-PEG blend nanoparticles after oral administration in rats. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 101, p. 353-360, 2013.

KHAN, M.M.; AHMAD, A.; ISHRAT, T.; KHAN, M.B.; HODA, M. N.; KHUWAJA, G.; RAZA, S.S.; KHAN, A.; JAVED, A.; VAIBHAV, K.; ISLAM, F. Resveratrol attenuates 6-hydroxydopamine-induced oxidative damage and dopamine depletion in rat model of Parkinson's disease. **Brain Research**, v. 1328, p. 139-151, 2010.

KHAN, M. M.; KEMPURAJ, D.; THANGAVEL, R.; ZAHEER, A. Protection of MPTP-induced neuroinflammation and neurodegeneration by Pycnogenol. **Neurochemistry International**, v. 62, p. 379-388, 2013.

KIM, S.; NG, W.K.; DONG, Y.; DAS, S.; TAN, R.B.H. Preparation and physicochemical characterization of *trans*-resveratrol nanoparticles by temperature-controlled antisolvent precipitation. **Journal of Food Engineering**, v. 108, p. 37-42, 2012.

KREUTER, J.; PETROV, V. E.; KHARKEVICH, D.A.; ALYAUTDIN, R.N. Influence of the type of surfactant on the analgesic effects induced by the peptide dalargin after its delivery across the blood–brain barrier using surfactant-coated nanoparticles. **Journal of Control Release**, v. 49, p. 81–87, 1997.

KRISTL, J.; TESKAC, K.; CADDEO, C.; ABRAMOVIC, Z.; ŠENTJURC, M. Improvements of cellular stress response on resveratrol in liposomes. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 73, p. 253-259, 2009.

KUMAR, P.; PADI, S. S.; NAIDU, P. S.; KUMAR, A. Effect of resveratrol on 3-nitropropionic acid-induced biochemical and behavioural changes: possible neuroprotective mechanisms. **Behavioural Pharmacology**, v. 17, p. 485–492, 2006.

KUMAR, A.; NAIDU, P. S.; SEGHAL, N.; PADI, S.S. Neuroprotective effects of resveratrol against intracerebroventricular colchicine-induced cognitive impairment and oxidative stress in rats. **Pharmacology**, v. 79, p. 17–26, 2007.

KUMARI, A.; YADAV, S. K.; YADAV, S. C. Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 75, p. 1–18, 2010.

KUMARI, A.; KUMAR, V.; YADAV, S. K. Plant Extract Synthesized PLA Nanoparticles for Controlled and Sustained Release of Quercetin: A Green Approach. **PLoS ONE**, v. 7, n. 7, 2012.

KÜRTI, L.; KUKOVECZ, Á.; KOZMA, G.; AMBRUS, R.; DELI, M. A.; SZABÓ-RÉVÉSZ, P. Study of the parameters influencing the co-grinding process for the production of meloxicam nanoparticles. **Powder Technology**, v. 212, p. 210-217, 2011.

LE CORRE, L.; FUSTIER, P.; CHALABI, N.; BIGNON, Y.J.; BERNARD-GALLON, D. Effects of resveratrol on the expression of a panel of genes interacting with the BRCA1 oncosuppressor in human breast cell lines, **Clinica Chimica Acta**, v. 344, p. 115–121, 2004.

LEVIN, V. A. Relationship of octanol/water partition coefficient and molecular weight to rat brain capillary permeability. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 23, p. 682–684, 1980.

LI, S-D.; HUANG, L. Pharmacokinetics and biodistribution of nanoparticles. **Molecular Pharmaceutics**, v. 5, n. 4, p. 496–504, 2008.

LI, H-J; ZHANG, A-Q; HU, Y; SUI, L; QIAN, D-J; CHEN, M. Large-scale synthesis and self-organization of silver nanoparticles with Tween 80 as a reductant and stabilizer. **Nanoscale Research Letters**, v. 7, p. 612-625, 2012.

LIM, S-J.; KIM, C-K. Formulation parameters determining the physicochemical characteristics of solid lipid nanoparticles loaded with all-trans retinoic acid, **International Journal of Pharmaceutics**, v. 243, p. 135–146, 2002.

LINDNER, G. R.; KHALIL, N. M.; MAINARDES, R. M. Resveratrol-loaded polymeric nanoparticles: validation of an HPLC-PDA method to determine the drug entrapment and evaluation of its antioxidant activity. **Scientific World Journal**, v. 2013, p. 9, 2013.

LOPES, W. A.; FASCIO, M. Esquema para interpretação de espectros de substâncias orgânicas na região do infravermelho. **Química Nova**, vol. 27, n.4, p. 670-673, 2004.

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

LU, Z.; CHENG, B.; HU, Y.; ZHANG, Y.; ZOU, G. Complexation of resveratrol with cyclodextrins: Solubility and antioxidant activity. **Food Chemistry**, v. 113, p. 17-20, 2009.

LUCAS-ABELLÁN, C.; FORTEA, I.; LÓPEZ-NICOLÁS, J.M.; NÚÑEZ-DELICADO, E. Cyclodextrins as resveratrol carrier system. **Food Chemistry**, v. 104, n. 39–44, 2007.

LUCAS-ABELLÁN, C.; MERCADER-ROS, M. T.; ZAFRILLA, M. P.; GABALDÓN, J. A.; NÚÑEZ-DELICADO, E. Comparative study of different methods to measure antioxidant activity of resveratrol in the presence of cyclodextrins. **Food and Chemical Toxicology**, v. 49, p. 1255-60, 2011.

LUCK, M. Plasma protein adsorption als möglicher Schlüsselfaktor für eine kontrollierte Arzneistoffapplikation mit partikulären Trägern. Dissertação de Doutorado. Berlin: Freie Universität; 1997.

MAINARDES, R.M.; EVANGELISTA, R.C. PLGA nanoparticles containing praziquantel: effect of formulation variables on size distribution. **International Journal of Pharmaceutics**, v.16, p.137-144. 2005.

MAINARDES, R. M.; GREMIÃO, M. P. Nanoencapsulation and characterization of zidovudine on poly(L-lactide) and poly(L-lactide)-poly(ethylene glycol)-blend nanoparticles. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 12, p. 8513-8521,

2012.

MAINARDES, R. M.; GREMIÃO, M. P. D.; EVANGELISTA, R. C. Thermoanalytical study of praziquantel-loaded PLGA nanoparticles. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, p. 523-530, 2006.

MAINARDES, R. M.; KHALIL, N. M.; GREMIÃO, M. P. D. Intranasal delivery of zidovudine by PLA and PLA-PEG blend nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 395, p. 266-271, 2010.

MAZZIO, E. A.; HARRIS, N.; SOLIMAN, K. F. Food constituents attenuate monoamine oxidase activity and peroxide levels in C6 astrocyte cells. **Planta Medica**, 1998.

MENDES, J. B. E.; RIEKES, OLIVEIRA, M. K.; MATOSO V.; DOMINGOS, M. M.; STULZER, H. K.; KHALIL, N. M.; ZAWADZKI, S. F.; MAINARDES, R. M.; FARAGO, P.V. PHBV/PCL Microparticles for Controlled Release of Resveratrol: Physicochemical Characterization, Antioxidant Potential, and Effect on Hemolysis of Human Erythrocytes. **The Scientific World Journal**, v. 2012, p. 1-13, 2012.

MÉRILLON, J. M.; FAUCONNEAU, B.; WAFFO, P.; BARRIER, L.; VERCAUTEREN, J.; HUGUET, F. Antioxidant activity of the stilbene astringin, newly extracted from *Vitis vinifera* cell cultures. **Clinical Chemistry**, v. 43, p. 1092–1093, 1997.

MORA-HUERTAS, C. E.; FESSI, H.; ELAISSARI, A. Influence of process and formulation parameters on the formation of submicron. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 163, p. 90–122, 2011.

MOSQUEIRA, V. C. F.; LEGRAND, P.; GULIK, A.; BOURDON O. Relationship between complement activation, cellular uptake and surface physicochemical aspects of novel PEG-modified nanocapsules. **Biomaterials**, v. 22, p. 2967-2979, 2001.

NAIR, H. B.; SUNG, B.; YADAV, V. R.; KANNAPPAN, R.; CHATURVEDI, M. M.; AGGARWAL, B. B. Delivery of antiinflammatory nutraceuticals by nanoparticles for

the prevention and treatment of cancer, **Biochemical Pharmacology**, v. 80, p. 1833-1843, 2010.

NAM, J. B.; RYU, J. H.; KIM, J. W.; CHANG, I. S.; SUH, K. D. Stabilization of resveratrol immobilized in monodisperse cyano-functionalized porous polymeric microspheres. **Polymer**, v. 46, p. 8956–8963, 2005.

NARAYANAN, N. K.; D. NARGI, N. K.; RANDOLPH, C.; NARAYANAN B. A. Liposome encapsulation of curcumin and resveratrol in combination reduces prostate cancer incidence in PTEN knockout mice. **International Journal of Cancer**, v.125, p. 1–8, 2009.

NEEDHAM, D., HRISTOVA, K., MCLINTOSH, T. J., DEWHIRST, M., WU, N.; LASIC, D. D. Polymer grafted liposomes: physical basis for the "stealth" property, **Journal of Liposome Research**, v. 2, p. 411-430, 1992(a).

NEEDHAM, D., MCINTOSH, T. J.; LASIC, D. D. Repulsive interactions and mechanical stability of polymer-grafter lipid membranes. **Biochimica and Biophysica Acta**, v. 1108, p. 40-48, 1992(b).

NECKEL, G. L. Avaliação do potencial de utilização de nanocápsulas poliméricas na melhoria da resposta antimetastática de um alcalóide citotóxico, a camptotecina. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Santa Catarina, Santa Catarina, 2006.

NECKEL, G. L.; LEMOS-SENNA, E. Preparação e caracterização de nanocápsulas contendo camptotecina a partir do poli (D,L-lático) e copolímeros diblocos do poli (D,L-lático) e polietilenoglicol. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v. 24, p. 504-511, 2005.

NEUWELT, E. A.; MARAVILLA, K. R.; FRENKEL, E. P.; RAPAPORT, S. I.; HILL, S. A.; BARNETT, P. A. Osmotic blood–brain barrier disruption. Computerized tomographic monitoring of chemotherapeutic agent delivery, **Journal of Clinical Investigation**, v. 64, p. 684–688, 1979.

NEVES, A. R.; LÚCIO, M.; MARTINS, S.; LIMA, J. L.; REIS, S. Novel resveratrol nanodelivery systems based on lipid nanoparticles to enhance its oral bioavailability. **Int Journal of Nanomedicine**, v. 8, p.177-187, 2013.

NUNES, A.; AL-JAMAL, K. T.; KOSTARELOS, K. Therapeutics, imaging and toxicity of nanomaterials in the central nervous system. **Journal of Controlled Release**, v. 161, p. 290-306, 2012.

OGANESYAN, E. A.; MIROSHNICHENKO, I. I.; VIKHRIEVA, N. S.; LYASHENKO, A. A.; LESHKOV, S. Y. Use of nanoparticles to increase the systemic bioavailability of *trans*-resveratrol. **Pharmaceutical Chemistry Journal** v. 44, p. 25-27, 2010.

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

OKAWARA, M.; KATSUKI, H.; KURIMOTO, E.; SHIBATA, H.; KUME, T.; AKAIKE, A. Resveratrol protects dopaminergic neurons in midbrain slice culture from multiple insults. **Biochemical Pharmacology**, v. 73, p. 550-60, 2007.

OLIVIER, J. C. Drug Transport to Brain with Targeted Nanoparticles. **NeuroRx**, v. 2, p. 108 –119, 2005.

OLIVIER, J. C.; FENART, L.; CHAUVET, R.; PARIAT, C.; CECHELLI, R.; COUET, W. Indirect evidence that drug brain targeting using polysorbate 80-coated Polybutylcyanoacrylate nanoparticles is related to toxicity. **Pharmaceutical Research**, v. 16, p. 1836–1842, 1999.

OWENS, D. E. Opsonization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 307, p. 93-102, 2006.

PANDEY, K. B.; RIZVI, S. I. Resveratrol may protect plasma proteins from oxidation under conditions of oxidative stress in vitro. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 21, p. 909-913, 2010.

PARDRIDGE, W. M. Crossing the blood–brain barrier: are we getting it right? **Drug Discovery Today**, v. 6, p. 1–2, 2001.

PARKER, J. A.; ARANGO, M.; ABDERRAHMANE, S.; LAMBERT, E.; TOURETTE, C.; CATOIRE, H.; NERI, C. Resveratrol rescues mutant polyglutamine cytotoxicity in nematode and mammalian neurons, **Nature Genetics**, v. 37, p. 349–350, 2005.

PARVEEN, S.; MISRA, R.; SAHOO, S.K. Nanoparticles: a boon to drug delivery, therapeutics, diagnostics and imaging. **Nanomedicine**, v. 8, p. 147–166, 2012.

PATEL, S.K.; WONG, A.L.; CUEVAS, M.; HORN, H. V. Parenting stress and neurocognitive late effects in childhood cancer survivors. **Psycho-oncology**, 2012.

PENG, H.; XIONG, H.; LI, J.; XIE, M.; LIU, Y.; BAI, C.; CHEN, L. Vanillin crosslinked chitosan microspheres for controlled release of resveratrol. **Food Chemistry**, v. 121, p. 23-28, 2010.

PINTO REIS, C.; NEUFELD, R. J.; RIBEIRO, A. J.; VEIGA, F. Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles. **Nanomedicine**, v. 2, p. 8-21, 2006.

PREDIGER, R. D. S.; TAKAHASHI, R. N. Ethanol improves short-term social memory in rats. Involvement of opioid and muscarinic receptors. **European Journal Pharmacology** 462, 115–123, 2003.

PREDIGER, R. D. S., BATISTA, L. C., MIYOSHI, E., TAKAHASHI, R. N., Facilitation of short-term social memory by ethanol in rats is mediated by dopaminergic receptors. **Behavioural Brain Research**, v. 153, p. 149–157, 2004.

PREDIGER, R. D. S., BATISTA, L. C., TAKAHASHI, R. N. Caffeine reverses agerelated deficits in olfactory discrimination and social recognition memory in rats. Involvement of adenosine A1 and A2A receptors. **Neurobiology of Aging**, v. 26, p. 957–964, 2005.

PREDIGER, R. D.; TAKAHASHI, R.N. Modulation of short-term social memory in rats by adenosine A1 and A2A receptors. **Neuroscience Letters**, v. 376, p. 160–165, 2005.

PREDIGER, R. D. S.; BATISTA, L. C.; TAKAHASHI, R. N. Caffeine reverses age-related deficits in olfactory discrimination and social recognition memory in rats. Involvement of adenosine A1 and A2A receptors. **Neurobiology of Aging**, v. 26, p. 957–964, 2005.

PREDIGER, R. D.; BATISTA, L. C.; MEDEIROS, R.; PANDOLFO, P.; FLORIO, J. C.; TAKAHASHI, R. N. The risk is in the air: intranasal administration of MPTP to rats reproducing clinical features of Parkinson's disease. **Experimental Neurology**, v. 202, p. 391–403, 2006(a).

PREDIGER, R. D. S.; DE-MELLO, N.; TAKAHASHI, R. N. Pilocarpine improves olfactory discrimination and social recognition memory deficits in 24 month-old rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 531, p. 176–182, 2006(b).

PREDIGER, R. D.; RIAL, D.; MEDEIROS, R.; FIGUEIREDO, C. P.; DOTY, R. L.; TAKAHASHI, R. N. An intranasal MPTP (1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine) rat model of Parkinson's disease. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1170, p. 629–636, 2009.

PREDIGER, R. D.; AGUIAR, A. S. JR.; MOREIRA, E. L.; MATHEUS, F. C.; CASTRO, A. A.; WALZ, R.; DE BEM, A. F.; LATINI, A.; TASCA, C. I.; FARINA, M.; RAISMAN-VOZARI, R. The intranasal administration of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP): a new rodent model to test palliative and neuroprotective agents for Parkinson's disease. **Current Pharmaceutical Design**, v.17, p. 489-507, 2011.

QUINTANAR-GUERRERO, D.; FESSI, H.; ALLÉMANN, E.; DOELKER, E. Influence of stabilizing agents and preparative variables on the formation of poly(D,L-lactic acid) nanoparticles by na emulsification-diffusion. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 143, p. 133-141, 1996.

QUINTANAR-GUERRERO, D.; ALLÉMANN, E.; FESSI, H.; DOELKER, E. Preparation techniques and mechanisms of formation of biodegradable nanoparticles from preformed polymers. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v.24 p. 1113-28, 1998.

RAO, J. P.; GECKELER, K. E. Polymer nanoparticles: Preparation techniques and size-control parameters. **Progress in Polymer Science**, v. 36, p. 887-913, 2011.

RABESIAKA, M.; RAKOTONDRAMASY-RABESIAKA, L.; MABILLE, I.; PORTE, C.; HAVET, J. Extraction of trans-resveratrol from red wine and optimization by response surface methodology. **Separation and Purification Technology**, v. 81, p. 56-61, 2011.

RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS **radical** cation decolorization assay. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 26, p. 1231-1237, 1999.

REESE, T. S.; KARNOVSKY, M. J. Fine structural localization of a blood-brain barrier to exogenous peroxidase, **The Journal of Cell Biology**, v. 34, p. 207-217, 1967.

RIBEIRO, R. P.; MOREIRA, E. L.; SANTOS, D. B.; COLLE, D.; DOS SANTOS, D. A.; PERES, K. C.; FIGUEIREDO, C. P.; FARINA, M. Probuticol affords neuroprotection in a 6-OHDA mouse model of Parkinson's disease. **Neurochemical Research**, v. 38, p. 660-668, 2013.

RIEKES, M. K.; BARBOZA, F. M. ; VECCHIA, D. D.; BOHATCH. M. JR.; FARAGO, P.V.; FERNANDES, D; SILVA, M. A. S.; STULZER, H. K. "Evaluation of oral carvedilol microparticles prepared by simple emulsion technique using poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) and polycaprolactone as polymers". **Materials Science and Engineering C**, v. 31, p. 962-968, 2011.

RITGER, P. L.; PEPPAS, N. A. A simple equation for description of solute release II. Fickian and anomalous release from swellable devices. **Journal of Controlled Release**, v. 5, p. 37-42, 1987.

RODRÍGUEZ-DELGADO, M. A.; GONZÁLEZ, G.; PÉREZ-TRUJILLO, J. P.; GARCÍA-MONTELONGO, F. J. Trans-resveratrol in wines from the Canary Islands (Spain). Analysis by high performance liquid chromatography. **Food Chemistry**, v. 76, p. 371–375, 2002.

SAIKO, P.; SZAKMARY, A.; JAEGER, W.; SZEKERES, T. Resveratrol and its analogs: Defense against cancer, coronary disease and neurodegenerative maladies or just a fad? **Mutation Research**, v. 658, p. 68-94, 2008.

SERWER, L. P.; JAMES C. D. Challenges in drug delivery to tumors of the central nervous system: an overview of pharmacological and surgical considerations. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 64, p. 590–597, 2001.

SCHINKEL, A. P-Glycoprotein, a gatekeeper in the blood–brain barrier. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 36, p. 179–194, 1999.

SHARMA, A.; KAUR, P.; BINU KUMAR, B.; PRABHAKAR, S.; GILL, K. D. Plasma lipid peroxidation and antioxidant status of Parkinson's disease patients in the Indian population. **Parkinsonism & Related Disorders**, v. 14, p.52-57, 2008.

SHI, N.; ZHANG, Y.; ZHU, C.; BOADO, R. J.; PARDRIDGE, W. M. Brain-specific expression of an exogenous gene after i.v. administration. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 98, p. 12754- 12759, 2001.

SHI, G.; RAO, L.; YU, H.; XIANG, H.; YANG, H.; JI, R. Stabilization and encapsulation of photosensitive resveratrol within yeast cell. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 349, p. 83–93, 2008.

SHU, X. H.; LI, H.; SUN, Z.; WU, M. L.; MA, J. X.; WANG, J. M.; WANG, Q.; SUN, Y.; FU, Y. S.; CHEN, X. Y.; KONG, Q. Y.; LIU, J. Identification of metabolic pattern and bioactive form of resveratrol in human medulloblastoma cells. **Biochemical Pharmacology**, v. 15, p. 1516-1525, 2010.

SILVERSTEIN, R. M., WEBSTER, F. X., Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos, 6ª. ed. LTC: Livros Técnicos e Científicos, Rio de Janeiro, 2000.

SIEPMANN, J.; PEPPAS, N. A.; Modeling of drug release from delivery systems based on hydroxypropyl methylcellulose (HPMC). **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 48, p. 139-157, 2001.

SONG K. C.; LEE, H. S.; CHOUNG, I. Y.; CHO, K. I.; AHN, Y. CHOI, E. J. The effect of type of organic phase solvents on the particle size of poly(d,l-lactide-co-glycolide) nanoparticles. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical Engineering Aspects**, v. 276, p. 162–167, 2006.

SÖNMEZ, Ü.; SÖNMEZ, A.; ERBIL, G.; TEKMEHA, I.; BAYKARA, B. Neuroprotective effects of resveratrol against traumatic brain injury in immature rats **Neuroscience Letters**, v. 420, p.133–137, 2007.

SOPPIMATH, K. S.; AMINABHAVI, T. M.; KULKARNI, A. R.; RUDZINSKI, W. E. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. **Journal of Controlled Release**, v. 70, p. 1–20, 2001.

SRIVASTAVA, G.; DIXIT, A.; YADAV, S.; PATEL, D. K.; PRAKASH, O.; SINGH, M. P. Resveratrol potentiates cytochrome P450 2 d22-mediated neuroprotection in maneb- and paraquat-induced parkinsonism in the mouse. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 52, p. 1294–1306, 2012.

TAKAOKA, M. J. Of the phenolic substances of White hellebore (*Veratrum grandiflorum* Loes. fil.). **Journal of the Faculty of Science Hokkaido Imperial University**, v. 3, p. 1–16, 1940.

TOBIO, M.; GREF, R.; SANCHEZ, A.; LANGER, R.; ALONSO, M. J. Stealth PLA-PEG nanoparticles as protein carriers for nasal administration. **Pharmaceutical Research**, v. 15, p. 270-275, 1998.

VANDERHOFF , J. W.; EL AASSER, M. S.; UGELSTAD, J. Polymer emulsification process. **US Patent**, v. 4, p.177, p. 1979.

VALENZANO, D.R.; TERZIBASI, E.; GENADE, T.; CATTANEO, A.; DOMENICI, L.; CELLERINO, A. Resveratrol prolongs lifespan and retards the onset of age-related markers in a short-lived vertebrate. **Current Biology**, v. 16, p. 296–300, 2006.

VASSILIOU, A. A.; PAPADIMITRIOU, S. A.; BIKIARIS, D. N.; MATTHEOLABAKIS, G.; AVGOUSTAKIS, K. Facile synthesis of polyester-PEG triblock copolymers and preparation of amphiphilic nanoparticles as drug carriers. **Journal of Controlled Release**, v. 148, p. 388-395, 2010.

VENTURINI, C. G.; JÄGER, E.; OLIVEIRA, C. P.; BERNARDI, A.; BATTASTINI, A. M. O.; GUTERRES, S. S.; POHLMANN, A. R. Formulation of lipid core nanocapsules. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 375, p. 200-208, 2011.

VITORINO, C.; CARVALHO, F. A.; ALMEIDA, A. J.; SOUSA, J.; PAIS, A. A. C. C. The size of solid lipid nanoparticles: An interpretation from experimental design. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 84, p.117–130, 2011.

XING, J.; ZHANG, D.; TAN, T. Studies on the oridonin-loaded poly(d,l-lactic acid) nanoparticles in vitro and in vivo. **Internacional Journal of Biological Macromolecules**, v. 40, n. 2, 153–158, 2007.

XU, Y.; WANG, Z.; YOU, W.; ZHANG, X.; LI, S.; BARISH, P. A.; VERNON M. M.; DU, X.; LI, G.; PAN, J.; OGLE W. O. Antidepressant-like effect of trans-resveratrol: involvement of serotonin and noradrenaline system. **European Neuropsychopharmacology: The Journal of the European College of Neuropsychopharmacology**, v. 20, p. 405-413, 2010.

ZHANG, R.; SOMASUNDARAN, P. Advances in adsorption of surfactants and their mixtures at solid/solution interfaces. **Advanced in Colloid and Interface Science**, v. p. 123-126, 2006.

ZHANG, F.; SHI, J. S.; ZHOU, H.; WILSON, B.; HONG, J. S.; GAO, H. M. Resveratrol protects dopamine neurons against lipopolysaccharide-induced

neurotoxicity through its anti-inflammatory actions. **Molecular Pharmacology**, v. 78, n. 3, p. 466-77, 2010 (a).

ZHANG, Q. H.; XIONG, Q. P.; SHI, Y. Y.; ZHANG, D. Y. Study on preparation and characterization of resveratrol solid lipid nanoparticles and its anticancer effects in vitro. **Zhong Yao Cai**, v. 12, p.1929-1932, 2010 (b).

ZHANG, X. P.; LE, Y.; WANG, J. X.; ZHAO, H.; CHEN, J. F. Resveratrol nanodispersion with high stability and dissolution rate. **LWT - Food Science and Technology**, v. 50, p. 622-628, 2013.

WALLE, T.; HSIEH, F.; DELEGGE, M.K.; OATIS, J.E.; WALLE, K.; High absorption but very low bioavailability of oral resveratrol in humans. **Drug Metabolism & Disposition**, v. 32, p. 1377–1382, 2004.

WANG, Y.; XU, H.; FU, Q.; MA, R.; XIANG, J. Protective effect of resveratrol derived from *Polygonum cuspidatum* and its liposomal form on nigral cells in Parkinsonian rats. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 304, p. 29–34, 2011.

WOHLFART, S.; GELPERINA, S.; KREUTER, J. Transport of drugs across the blood–brain barrier by nanoparticles. **Journal of Controlled Release**, v. 20, p. 264-73, 2012.

WOOD, J. G.; ROGINA, B.; LAVU, S.; HOWITZ, K.; HELFAN, S. L.; TATAR, M.; SINCLAIR, D. Sirtuin activators mimic caloric restriction and delay ageing in metazoans. **Nature**, v. 430, p. 686–689, 2004.

WHO, Neurological disorders: public health challenges, **World Health Organization**, Geneva, 2006.

WU, L.; ZHANG, J.; WATANABE, W. Physical and chemical stability of drug nanoparticles. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 63, p. 456–469, 2011.

WU, P. F.; XIE, N.; ZHANG, J. J.; GUAN, X. L.; ZHOU, J.; LONG, L. H.; LI, Y. L.; XIONG, Q. J.; ZENG, J. H.; WANG, F.; CHEN, J. G. Resveratrol preconditioning increases methionine sulfoxide reductases A expression and enhances resistance of

human neuroblastoma cells to neurotoxins. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, 2012.