



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE - FURG  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS  
FISIOLOGIA ANIMAL COMPARADA

**PAPEL PROTETOR DA QUERCETINA LIVRE E NANOENCAPSULADA  
CONTRA DANOS INDUZIDOS PELA HEMORRAGIA INTRACEREBRAL EM  
RATOS**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

Ft. Aline Ribeiro Galho

Rio Grande, RS, Brasil

2014

**PAPEL PROTETOR DA QUERCETINA LIVRE E NANOENCAPSULADA  
CONTRA DANOS INDUZIDOS PELA HEMORRAGIA INTRACEREBRAL EM  
RATOS**

**POR**

**Ft. Aline Ribeiro Galho**

Dissertação apresentada ao programa de Pós – Graduação em Ciências Fisiológicas: Fisiologia Animal Comparada da Universidade Federal de Rio Grande (FURG) como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Fisiologia Animal Comparada.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Paula Horn

Co-orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Cristiana Lima Dora

**DEDICO:**

**Aos meus pais, exemplos de vida e ao meu noivo. Pessoas que com muita sabedoria, discernimento, bom senso e dedicação estiveram sempre ao meu lado nas horas difíceis e me aplaudindo nos momentos de glória. Obrigada por serem minha fonte de inspiração, meu apoio e pelo ensino diário.**

*“Quem não sabe aonde vai, não vai a lugar nenhum.”*

*(Luiz Marengo)*

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, pelo dom da vida, pelo consolo nas horas difíceis e por me fazer acreditar em um mundo melhor através de Sua graça. Obrigada Senhor por todos pedidos concedidos e por alimentar a minha fé (“E tudo o que pedirdes na oração, crendo, o receberéis.” Mt 21.22).

Agradeço a Universidade Federal do Rio Grande (FURG) e ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Animal Comparada pela grande oportunidade de ter estudado em uma instituição compromissada com a ciência. Também aos seus professores pelos ensinamentos e pela paciência.

A CAPES e ao CNPq pelo consentimento da bolsa no período do mestrado.

A minha família pelo apoio e pelo amor. Sem vocês jamais teria conseguido. Meu pai Luiz Osório e minha mãe Marione que me ensinaram a ler e escrever e que o estudo é um dos nossos grandes bens. Aos meus amados irmãos, Lucas e Larissa que aguentaram meus stress e foram meus parceiros, sempre torcendo por mim. Aos meus avós, Ione e José, Alcídia (*In memoriam*) e Amaral (*In memoriam*), que me deram amor e que rezaram por mim, aos meus tios, tias e primos, em especial a Andressa Busatta, mais do que uma prima, minha dinda, meu suporte das horas difíceis, minha companheira nas horas felizes, minha vitória também é de vocês. Vocês são os grandes responsáveis pelas minhas conquistas, meus alicerces, minha inspiração. Acompanharam-me desde o início da minha vida e participaram na construção do meu caráter.

Ao meu noivo, Rodrigo. Eu não tenho palavras para descrever o que tu significas na minha vida. Meu amor, meu amigo, meu companheiro, meu confidente, a ti devo todas as minhas conquistas. Não conseguiria chegar até aqui sem tua participação. Meu ombro, meu colo, minha ajuda nos experimentos, nas tabelas do Excel, nas contas e nos gráficos. Tu tens uma grande participação neste trabalho. Te amo muito.

Aos meus sogros, Mário e Beth, pelo incentivo, pelo amor e pela disposição de ajudar sempre. Vocês têm uma grande importância na minha vida e na minha vitória.

Aos meus amigos, em especial à Paula e ao Thiago. Agradeço por tudo que passamos juntos. Pelos ensinamentos, pelas experiências. Vocês são mais que amigos, são meus irmãos. Sem vocês esse período teria sido mais difícil. Obrigada pela amizade, pelos anos de convivência, pelos momentos inesquecíveis e eternizados na minha memória.

Meus amigos do GJPP, meus eternos amigos. Vocês foram fundamentais na minha formação. Me ensinaram muito, estiveram ao meu lado nesses quinze anos de amizade. Obrigada por tudo. Amo vocês. Estendo também as minhas lindas do Ruah, amigas que nasceram pela fé. Obrigada por tudo gurias.

Agradeço muito a minha orientadora, Ana Horn. Obrigada por cada ensinamento, pela paciência, pelo sorriso contagiante e por ter me recebido tão bem. Vim de uma universidade com pouco incentivo à pesquisa e posso dizer que tu que me ensinastes a

fazer pesquisa, desde pipetar a como agir nos laboratórios. Jamais vou esquecer de ti. Muito obrigada.

Minha amiga querida Maria Fernanda, que me acompanha desde a faculdade, e que me ajudou em cada momento, muito obrigada. Por tudo que passamos juntas, mates e bolachinhas, alegrias e tristezas, angústias e medos compartilhados. Sem ti, com certeza não teria feito esse mestrado. Obrigada amiga.

Aos meus colegas da pós, em especial ao André. Obrigada por tudo, todos os ensinamentos e toda ajuda que me deste desde a seleção. Sem tua ajuda também não teria conseguido. Aos amigos do LabNeuro, especialmente à Gisele, Carol e a Lidi, que além de colegas foram amigas, compartilhando comigo dúvidas e ensinamentos, vocês foram fundamentais nesse período. Obrigada por tudo gurias, vou levar todos comigo. Minha querida amiga e colega de profissão Fran, fostes muito importante nessa fase. Obrigada pelos dias que passamos juntas, pelas viagens aos sábados, pelas conversas e por tua amizade. Minha amiga Kamila, por ter me ensinado muito, a quem devo muitos dos aprendizados que tive neste mestrado. À prof. Daniela Barros, obrigada pelos ensinamentos e por todas as oportunidades.

Meus colegas de laboratório, Magno, Suellen, Matheus e em especial à Débora e ao Marcos, que foram meus fiéis ajudantes em dias de cirurgia. Compartilhamos muitos momentos tensos, muitas dúvidas, mas sempre conseguimos superar juntos. Jamais vou esquecer nossos dias de experimento, de eutanásia, de cirurgia, finais de semanas de trabalho. Obrigada por toda a ajuda e por terem deixado mais “leves” os dias difíceis. Sem vocês esse trabalho não sairia.

Agradeço a minha co-orientadora Cristiana, ao pessoal do NanoBio, mas principalmente para a Gabi, que fundamental para execução desse trabalho, me ensinando e fazendo as formulações. Essa ajuda foi fundamental. Também a Prof Juliane pela bioquímica, sempre disposta a esclarecer as dúvidas.

A cada um, meu sincero obrigada. Levo vocês em meu coração e esse trabalho tem a participação de cada um de vocês.

## RESUMO

GALHO, Aline Ribeiro. **Papel protetor da quercetina livre e nanoencapsulada contra danos induzidos pela hemorragia intracerebral em ratos.** 2014. 78 p. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas: Fisiologia Animal Comparada. Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande.

A hemorragia intracerebral (HIC) é um importante problema de saúde pública, que leva a altas taxas de morte e incapacidade em adultos. Estudos experimentais têm demonstrado que o estresse oxidativo desempenha um papel importante na patogênese da hemorragia intracerebral e pode representar um alvo para o tratamento. Sabemos da dificuldade de administrar compostos ao Sistema nervoso central (SNC), em razão da barreira hematoencefálica (BHE). Neste estudo foram comparados os efeitos de uma nanoemulsão contendo a quercetina com a forma livre da droga, em suspensão, em um modelo de HIC por injeção de colagenase em ratos. A quercetina (QU) é um polifenol que apresenta efeito antioxidante *in vitro* bem descrito na literatura, mas que, em função da sua alta lipofilicidade, possui uma baixa biodisponibilidade *in vivo*. Assim, os sistemas de liberação de fármacos apresentam-se como alternativa para a administração deste composto, pois possibilitam um aumento da sua absorção no sítio de ação por tempo prolongado. Os animais foram tratados com uma dose intraperitoneal de QU livre e nanoencapsulada de 30 mg/kg. Durante três dias foram realizados testes comportamentais, tais como o campo aberto, teste de motricidade em grade e teste em haste elevada. Setenta e duas horas após a cirurgia foi feita a eutanásia e avaliamos o tamanho do hematoma e realizamos dosagens bioquímicas (atividade da GCL, conteúdo de GSH, ACAP e TBARS). Os animais que receberam a nanoemulsão contendo QU (N-QU) tiveram uma melhora significativa no escore do teste do deslocamento em haste elevada e no campo aberto. A QU livre em suspensão (QU-SP) obteve melhora apenas no campo aberto. A QU-N foi capaz de reduzir o tamanho do hematoma, preservar a atividade da GST, aumentar conteúdo de GSH e a capacidade antioxidante. Já a QU-SP influenciou apenas no conteúdo de GSH e no aumento da capacidade antioxidante. Desta forma, pode ser observado que a quercetina possuiu atividade antioxidante em ambas formas administradas, mas que a sua incorporação em nanoemulsões sugere aumento da biodisponibilidade e conseqüentemente aumento no efeito antioxidante, refletindo na melhora do déficit motor e no tamanho do hematoma em um modelo de HIC em ratos. Esses resultados indicam que a nanoemulsão contendo quercetina, desenvolvida neste trabalho, pode ser promissora para o tratamento da hemorragia intracerebral.

Palavras-chave: Quercetina, nanoemulsão, hemorragia intracerebral, atividade locomotora, resposta antioxidante.

## ABSTRACT

GALHO, Aline Ribeiro. **Protective role of free and nanoencapsulated quercetin against damage induced by intracerebral hemorrhage in rats.** 2014. 78 p. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas: Fisiologia Animal Comparada. Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande.

Intracerebral hemorrhage (ICH) is a major public health problem, which leads to high rates of death and disability in adults. Experimental studies have shown that oxidative stress plays an important role in the pathogenesis of intracerebral hemorrhage and could represent a target for treatment. We know the difficulty of administering compounds to the central nervous system (CNS), because of the blood brain barrier (BBB). This study compared the effects of a nanoemulsion containing quercetin with the free form of the drug in a collagenase-induced ICH model in rats. Quercetin (QU) is a polyphenol that has antioxidant effect in vitro but due to its high lipophilicity has low bioavailability in vivo. Thus, systems for drug delivery are presented as an alternative to the administration of this compound, as it allows for increased absorption at the site of action for a long time. The animals were treated with a QU IP 30 mg / kg. For three days behavioral tests such as the open field, foot fault and beam walking. Seventy-two hours after surgery the size of the hematoma was evaluated and biochemical measurements (GCL activity, GSH content, TBARS and ACAP) were performed. Animals receiving the nanoemulsion containing QU (QU-N) had a significant improvement in the score of beam walking and the open field tests. Also, QU-N was able to reduce the size of the hematoma, preserve the activity of GST , increasing GSH content and antioxidant capacity. QU-SP influenced only the open field test, the content of GSH and increased antioxidant capacity . Thus, it can be observed that quercetin possessed antioxidant activity in both forms administered, but their incorporation into nanoemulsions seems to increase their bioavailability and consequently enhance the antioxidant effect, reflecting the improvement of motor deficit and the size of the hematoma in a model of ICH in rats. These results indicate that the nanoemulsion containing quercetin developed in this study may be promising for the treatment of intracerebral hemorrhage.

Keywords: Quercetin, nanoemulsion, intracerebral hemorrhage, locomotory activity, antioxidant.



## LISTA DE FIGURAS

### PARTE I:

|  |    |
|--|----|
| FIGURA 1 – AVC isquêmico e AVC hemorrágico.....                        | 12 |
| FIGURA 2 – Consequências patológicas da HIC.....                       | 20 |
| FIGURA 3 – Reação de redução do O <sub>2</sub> e formação das ERO..... | 16 |
| FIGURA 4 – Estrutura química da quercetina.....                        | 24 |
| FIGURA 5 – Estrutura e transporte de fármacos através da BHE.....      | 27 |
| FIGURA 6 - Hemicorpo afetado pós AVC.....                              | 31 |

### PARTE II:

|   |    |
|---|----|
| FIGURA 1 – Cumulative percentage of QU released from nanoemulsions.....           | 76 |
| FIGURA 2 – Open field test performed 24h after stereotaxic surgery .....          | 77 |
| FIGURA 3 – Beam walking test performed 24 and 48h after stereotaxic surgery ..... | 78 |
| FIGURA 4 - Foot fault test performed 24 and 72h after stereotaxic surgery.....    | 79 |
| FIGURA 5 – The body weight .....  | 79 |
| FIGURA 6 - Hematoma size 72h after ICH.....                                       | 80 |
| TABELA 1 - Quercetin nanoemulsions characterization.....                          | 80 |
| TABELA - Antioxidant dosages performed 72h after ICH.....                         | 80 |

## SUMÁRIO

### PARTE I

|   |    |
|---|----|
| RESUMO .....  | 07 |
| ABSTRACT .....  | 08 |
| 1. INTRODUÇÃO .....   | 12 |
| 1.1.ACIDENTE VASCULAR CEREBRAL .....  | 12 |
| 1.1.1. ACIDENTE VASCULAR CEREBRAL ISQUÊMICO .....                               | 13 |
| 1.1.2. ACIDENTE VASCULAR CEREBRAL HEMORRÁGICO .....                             | 13 |
| 1.1.3. PATOLOGIA DA HEMORRAGIA INTRACEREBRAL .....                              | 14 |
| 1.1.3.1.ESTRESSE OXIDATIVO .....  | 15 |
| 1.1.3.2.INFLAMAÇÃO.....   | 17 |
| 1.2.QUERCETINA.....   | 21 |
| 1.3.TRANSPORTE DE FÁRMACOS ATRAVÉS DA BARREIRA<br>HEMATOENCEFÁLICA PÓS HIC..... | 25 |
| 1.4.NANOCARREADORES DE FÁRMACOS.....  | 27 |
| 2. OBJETIVOS.....   | 31 |
| 2.1.OBJETIVO GERAL.....   | 31 |
| 2.2.OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....  | 31 |

### PARTE II

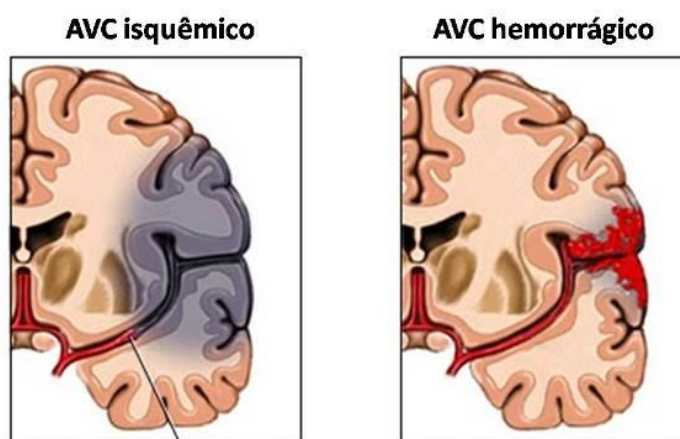
|  |    |
|--|----|
| ABSTRACT.....  | 36 |
| 1. INTRODUCTION.....   | 38 |
| 2. MATERIAL AND METHODS .....  | 40 |
| 2.1. Materials.....  | 40 |
| 2.2. Preparation of quercetin suspension and quercetin nanoemulsion..... | 40 |
| 2.3. Quercetin content determination and nanoemulsion recovery .....     | 41 |
| 2.4. Particle size analysis .....  | 41 |
| 2.5. In vitro release studies .....                                      | 42 |
| 2.6. Animals .....   | 43 |
| 2.7. Intracerebral Hemorrhage induction .....                            | 43 |
| 2.8. Experimental Groups .....   | 44 |
| 2.9. Doses of Quercetin .....  | 45 |
| 2.10. Behavioral evaluation of the animals .....                         | 45 |

|   |    |
|---|----|
| 2.10.1. Open Field .....  | 45 |
| 2.10.2. Beam walking test .....   | 46 |
| 2.10.3. Foot fault test .....   | 46 |
| 2.11. Measurement of the hematoma size .....  | 47 |
| 2.12. Biochemical analysis .....  | 47 |
| 2.12.1.Preparation of homogenized of brain tissue .....                                   | 47 |
| 2.12.2. Levels of reduced glutathione (GSH) .....   | 47 |
| 2.12.3.Determination of total antioxidant capacity .....                                  | 48 |
| 2.12.4.Determination of glutathione-S-transferase activity (GST) .....                    | 48 |
| 2.12.5.Determination of lipid oxidative damage .....                                      | 48 |
| 2.13. Statistical Analysis .....  | 49 |
| 3. RESULTS .....  | 49 |
| 3.1.Nanoemulsion characterization .....   | 49 |
| 3.2. Influence of administration of quercetin on behavioral tests .....                   | 50 |
| 3.2.1 Open Field .....  | 51 |
| 3.2.2. Beam walking .....   | 51 |
| 3.2.3. Foot Fault .....   | 51 |
| 3.3. Assessment of body weight .....  | 51 |
| 3.4. Assessment of hematoma size .....  | 51 |
| 3.5. Enzymatic activity and oxidative damage .....  | 52 |
| 3.5.1. Levels of reduced glutathione (GSH) .....  | 52 |
| 3.5.2. Activity of glutathione-S-transferase (GST) .....                                  | 52 |
| 3.5.3. Determination of the antioxidant capacity against peroxil radicals<br>(ACAP) ..... | 52 |
| 3.5.4. Determination of lipid oxidative damage (TBARS) .....                              | 52 |
| 4. DISCUSSION .....   | 53 |
| ACKNOWLEDGMENTS .....   | 63 |
| 5. REFERENCES .....   | 64 |
| PARTE III   |    |
| CONSIDERAÇÕES FINAIS .....  | 81 |
| PERSPECTIVAS .....  | 82 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....  | 83 |

## 1. INTRODUÇÃO:

### 1.1. Acidente Vascular Cerebral

O acidente vascular cerebral (AVC) é classicamente caracterizado como um déficit neurológico, atribuído a uma lesão focal aguda do sistema nervoso central (SNC) (SACCO *et. al.*, 2013). Trata-se de uma síndrome clínica que consiste no rápido desenvolvimento de sinais focais (ou globais no caso de coma) de distúrbio da atividade neurológica com duração superior a 24 horas ou que leva à morte, sem outra causa aparente além da origem vascular. Pode ocorrer por meio isquêmico ou hemorrágico, resultando em perda da função neurológica (ROWLAND *et. al.*, 2008; KATSUKI *et. al.*, 2010). Essa patologia está associada a elevados índices de morbidade e mortalidade na população mundial. Segundo estimativas da Organização Mundial da Saúde (OMS), o AVC é a segunda causa de morte mundo, atrás apenas das doenças cardíacas, ocasionando 5,8 milhões de mortes, equivalente a 10% do total (KRISHNAMURTHI *et. al.*, 2013). No Brasil, as doenças cardiovasculares assumem especial relevância como a primeira causa de morte. Dados do ministério da saúde apontam que 32% dos casos de morte são atribuídos a esse grupo de doenças e, dentre essas, as doenças cerebrovasculares, como o AVC, são responsáveis por 10,1% das mortes (LOTUFO *et. al.*, 2010). Quanto a sua etiologia, essa patologia divide-se em dois subtipos: AVC isquêmico e AVC hemorrágico ou hemorragia intracerebral (**Figura 1**) (SACCO *et. al.*, 2013).



**Figura 1:** AVC isquêmico e AVC hemorrágico respectivamente. Adaptado de NETTER, 2006.

### **1.1.1. Acidente Vascular Cerebral Isquêmico:**

É causado por um fluxo sanguíneo insuficiente em parte ou em todo o cérebro e representa cerca de 80% dos casos de AVC (LOTUFO *et. al.*, 2010). A partir daí, podemos ter duas definições levando em consideração principalmente o mecanismo da lesão e a área afetada: acidente vascular cerebral isquêmico focal e isquemia global (SOLER *et. al.*, 2010). Existem diferenças significativas na patologia entre a focal e a global. A isquemia focal ocorre dentro do território da perfusão de uma artéria que é estenosada ou obstruída, e a morte celular está localizada para esta região (MICHALSKI *et. al.*, 2011). Nesse tipo de isquemia, a morte celular é máxima no foco isquêmico e pode estender-se para a penumbra – uma área parcialmente perfundida, mas ainda viável ao redor do processo isquêmico -, com todos os elementos celulares, incluindo neurônios e células da glia afetadas. Em contraste, a isquemia global é resultado da diminuição da perfusão cerebral, como em quedas drásticas da pressão arterial (estado de choque ou parada cardíaca) ou aumento severo da pressão intracraniana (por exemplo, traumatismo craniano grave). Neste caso, a perda neuronal seletiva parece ocorrer em áreas vulneráveis do hipocampo, neocórtex cerebral (tálamo), no cerebelo, e gânglios da base não sendo isolado com distribuições específicas vasculares. Além disso, aplica-se a definição de morte celular prolongada, atribuível a isquemia global no SNC que incluem fontes de lesão, tais como a anóxia provocada por doenças das vias aéreas ou do pulmão e algumas lesões metabólicas, que são distintamente origem não vascular (ELLISON *et. al.*, 2004; KALRA 2009; MACRAE *et.al.*, 2011).

### **1.1.2. Acidente Vascular Cerebral Hemorrágico**

AVC hemorrágico ou hemorragia intracerebral (HIC) é definido como o extravasamento espontâneo de sangue no interior do parênquima cerebral. Embora menos comum do que o isquêmico (20% dos tipos de AVCs) tem um impacto significativo para a saúde pública devido à maior mortalidade e morbidade associadas. Formas não-traumáticas da HIC levam a deficiência catastrófica, a morbidade e a uma mortalidade de 30% a 50% em 30 dias (SACCO *et. al.*, 2013).

Dependendo da causa subjacente de hemorragia, a HIC pode ser classificada como primária, quando se origina a partir da ruptura espontânea de pequenas arteríolas danificados pela hipertensão crônica ou angiopatia amilóide cerebral, representando pelo menos 85% de todos os casos, ou secundária, quando está associada a malformações vasculares, hemorragia relacionada a um acidente vascular cerebral isquêmico, tumores, coagulação anormal, trauma, ou vasculite. Em aproximadamente 40% dos casos, o sangue pode também estender-se aos ventrículos - hemorragia intraventricular - potencialmente conduzindo à morte neurológica relacionada com hidrocefalia obstrutiva aguda resultando numa substancial agravamento do prognóstico (HAZRATI, *et. al.*, 2009; IADECOLA *et. al.*, 2011).

Os fatores de risco incluem o tabagismo, abuso de álcool, drogas, fenilpropanolamina e outros simpatomiméticos, hipertensão arterial descontrolada, malformação vascular, angiopatia amilóide, etc. Como principal sequela tem-se a hemiplegia ou a hemiparesia, que é a paralisia dos músculos do hemicorpo contralateral ao lado do cérebro em que ocorreu a lesão (KATSUKI *et. al.*, 2010).

Apesar das tentativas em curso para encontrar intervenções eficazes com base no entendimento fisiopatológico da doença, as opções são limitadas, e os resultados continuam a ser pobres. Terapias médicas baseadas em evidências para HIC são limitadas a orientações ou opções de redução sobre a pressão arterial (PA), monitoramento da pressão intracraniana (PIC), cirurgia para drenagem do edema, etc. (QURESHI *et. al.*, 2009).

A HIC espontânea ocorre predominantemente nas porções profundas dos hemisférios cerebrais. Sua localização mais comum é o putâmen; este local é responsável por 35% a 50% dos casos (XI *et. al.*, 2006).

### **1.1.3. Patologia da Hemorragia Intracerebral**

Há uma série de eventos desencadeados pela HIC, que culminam nas reações patológicas responsáveis por agravar os déficits neurológicos pós HIC. A ruptura de um vaso sanguíneo e o extravasamento de sangue para o parênquima cerebral leva como consequência a ativação de diversos processos, como desestruturação da barreira hematoencefálica no local, liberação de componentes do sangue e ativação de processos

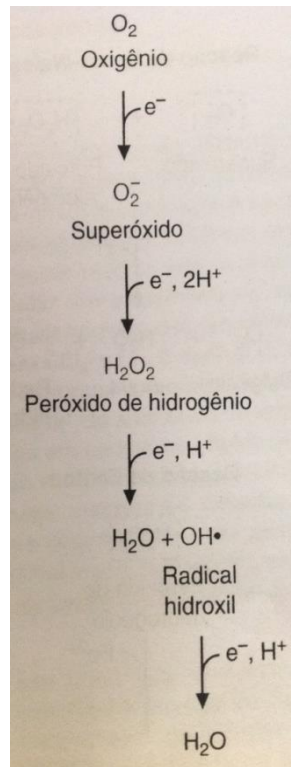
inflamatórios, que levam a morte das células do SNC (**Figura 2**) (XI *et. al.*, 2006; LIEW *et. al.*, 2012).

### 1.1.3.1. Estresse Oxidativo:

O estresse oxidativo é definido como a situação na qual a formação de espécies reativas excede significativamente a capacidade de defesa antioxidante e de reparo do organismo, tendo como consequência o aumento de danos a biomoléculas (DNA, lipídios, proteínas). Estes danos, quando não reparados, acabam comprometendo o funcionamento da célula e levando-a a morte (ARTS *et. al.*, 2005).

O metabolismo aeróbio apresenta uma série de reações que podem formar espécies reativas de oxigênio (**Figura 3**). Elétrons podem vazar da cadeia de transporte de elétrons reduzindo o  $O_2$  a radical ânion superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ). O superóxido também pode ser formado pela enzima NADPH oxidase, presente em diversas células. Em níveis elevados, o superóxido pode mobilizar o ferro da ferritina. A dismutação do  $O_2^{\bullet-}$  catalisada pelas superóxido dismutases (SOD) produz peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ). Níveis elevados de  $H_2O_2$  podem liberar íons de ferro de heme proteínas, como hemoglobina e o citocromo. O ferro (II) reduz  $H_2O_2$  a radical hidroxila ( $HO\bullet$ ) (reação de Fenton) e catalisa a formação de  $HO\bullet$  pela reação de Haber-Weiss. O  $HO\bullet$  é o radical mais reativo encontrado *in vivo*. Ele é capaz de oxidar carboidratos, lipídios, proteínas e DNA (MACÁKOVÁA *et. al.*, 2012; ZHAN *et. al.*, 2012).

O  $H_2O_2$  é eliminado pelas enzimas catalase, glutathione peroxidase e peroxirredoxinas, as quais atuam em conjunto com as SODs. A catalase dismuta  $H_2O_2$  a água e oxigênio. A glutathione peroxidase (GPx) remove  $H_2O_2$  pela oxidação de glutathione (GSH) ao dímero glutathione oxidada (GSSG). Este processo é complementado pela enzima glutathione redutase (GR), a qual recicla GSSG a GSH. Já as peroxirredoxinas (Prx) utilizam a proteína tioredoxina (Trx) (a qual contém dois grupos tióis) como substrato. A tioredoxina redutase (TrxR), converte a tioredoxina oxidada de volta a sua forma reduzida (WILLIAMS *et. al.*, 2004; MACÁKOVÁA *et. al.*, 2012).



**Figura 3:** Reação de redução do O<sub>2</sub> e formação das ERO. Retirado de MARKS *et. al.*, 2007.

Todos os tecidos humanos sofrem insultos oxidativos, porém, por diversas razões, o sistema nervoso central é especialmente sensível, de forma que a morte de neurônios induzida por toxinas ou pelo processo normal de envelhecimento pode causar sérios comprometimentos ao sistema nervoso. Também, características intrínsecas do SNC e de seu metabolismo o tornam mais propenso a danos causados por espécies oxidantes (STORZ *et. al.*, 2007).

O consumo de oxigênio pelo cérebro é muito elevado. Em humanos, o cérebro é responsável por cerca de 20% do consumo total de O<sub>2</sub>. A grande demanda por O<sub>2</sub> deve-se ao alto consumo de ATP pelos neurônios, para manter o potencial de membrana e o fluxo de neurotransmissores. Isto significa que os neurônios dependem muito da eficiência das mitocôndrias (JAIN *et. al.*, 2010). Todavia, elétrons podem vazar da cadeia de transporte de elétrons e gerar espécies reativas de oxigênio (ERO) que, por sua vez, podem danificar a mitocôndria. Em contrapartida, a mitocôndria lesada apresenta maior vazamento de elétrons e, conseqüentemente, produz mais ERO, gerando um ciclo vicioso (STORZ *et. al.*, 2007; PAPACOCEA *et. al.*, 2011).



Sabe-se que o AVC hemorrágico leva a um extravasamento de sangue para o parênquima cerebral e consequente isquemia no tecido localizado na área em que o vaso que sofreu o rompimento levaria o aporte sanguíneo. Durante a isquemia, os níveis de ATP caem e o AMP é degradado causando o acúmulo de hipoxantina. Os níveis de  $\text{Ca}^{+2}$  intracelular aumentam, ativando proteases, fosfolipases e NOS. A enzima xantina desidrogenase pode ser convertida à xantina oxidase pela oxidação de grupos  $-\text{SH}$  ou pela ação de proteases (LAO *et. al.*, 2005; PAPACOCEA *et. al.*, 2011).

Tecidos que sofreram isquemia por tempos relativamente curtos (no máximo 30 min para neurônios) podem ser recuperados pela reperfusão com sangue, reintroduzindo  $\text{O}_2$  e nutrientes. Porém, a reintrodução de  $\text{O}_2$  acaba causando insultos mediados por EROs. A NOS ativada pelo alto nível de  $\text{Ca}^{+2}$  resulta na formação de óxido nítrico e oxidantes dele derivados (BOUZAT *et. al.*, 2013). A xantina oxidase gerada durante a hipóxia oxida a hipoxantina acumulada gerando radical  $\text{O}_2^{\cdot-}$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ , peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ) e ânion radical carbonato ( $\text{CO}_3^{\cdot-}$ ). A isquemia também pode causar a liberação de metais de transição, promovendo a formação de  $\text{HO}^\bullet$ , e o dano de mitocôndrias, aumentando o "vazamento" de elétrons. No cérebro, ainda pode-se incluir como consequência da isquemia o aumento do nível de glutamato (promovendo excitotoxicidade) e a oxidação de neurotransmissores (CHAN *et. al.*, 2001).

Assim, percebe-se que há uma íntima relação entre a HIC e a geração de espécies reativas, levando-nos a investigar se a quercetina, uma molécula com potencial antioxidante descrito, é capaz de diminuir a lesão causada pela hemorragia.

### **1.1.3.2. Inflamação:**

A formação do hematoma no interior do parênquima cerebral após HIC inevitavelmente traz danos físicos para o tecido cerebral. Fatores igualmente importantes que contribuem para a patogênese da doença são a liberação de diversos componentes do sangue, como a trombina e a hemoglobina, bem como os seus produtos de degradação, que exercem ações biológicas ou influências tóxicas nas células cerebrais (OHNISHI *et. al.*, 2007; HAMOND *et. al.*, 2012). Estes acontecimentos, principalmente resultantes do extravasamento de sangue, também desencadeiam reações secundárias no parênquima cerebral, incluindo o recrutamento adicional de proteases, as respostas inflamatórias e intrínsecas dos sistemas citoprotetores (ARONOWSKI *et. al.*, 2011).

Outros eventos decorrentes, como a formação de edema no local afetado e a morte neuronal estão vinculados a diversos fatores. Um exemplo é o aumento de trombina, uma protease componente essencial na cascata de coagulação, que é produzida no cérebro imediatamente após uma HIC, como reação para interromper a hemorragia. No entanto, a infusão direta de grandes doses de trombina no cérebro provoca a infiltração de células inflamatórias e por consequência, repercussão na formação do edema cerebral (YE *et. al.*, 2006; OKAUCHI *et. al.*, 2010).

Também, o fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), uma das principais citocinas pró-inflamatórias, pode contribuir para a lesão cerebral após HIC. Os níveis de TNF- $\alpha$  no cérebro estão aumentados após a infusão intracerebral de trombina e HIC (ARBOIX *et. al.*, 2012). Além disso, a trombina ativa a metaloproteinase da matriz em células endoteliais. As metaloproteinases da matriz são membros de uma família de proteases dependentes de zinco que podem degradar a matriz extracelular e causam a ruptura da barreira hematoencefálica (MACLELLAN *et. al.*, 2006).

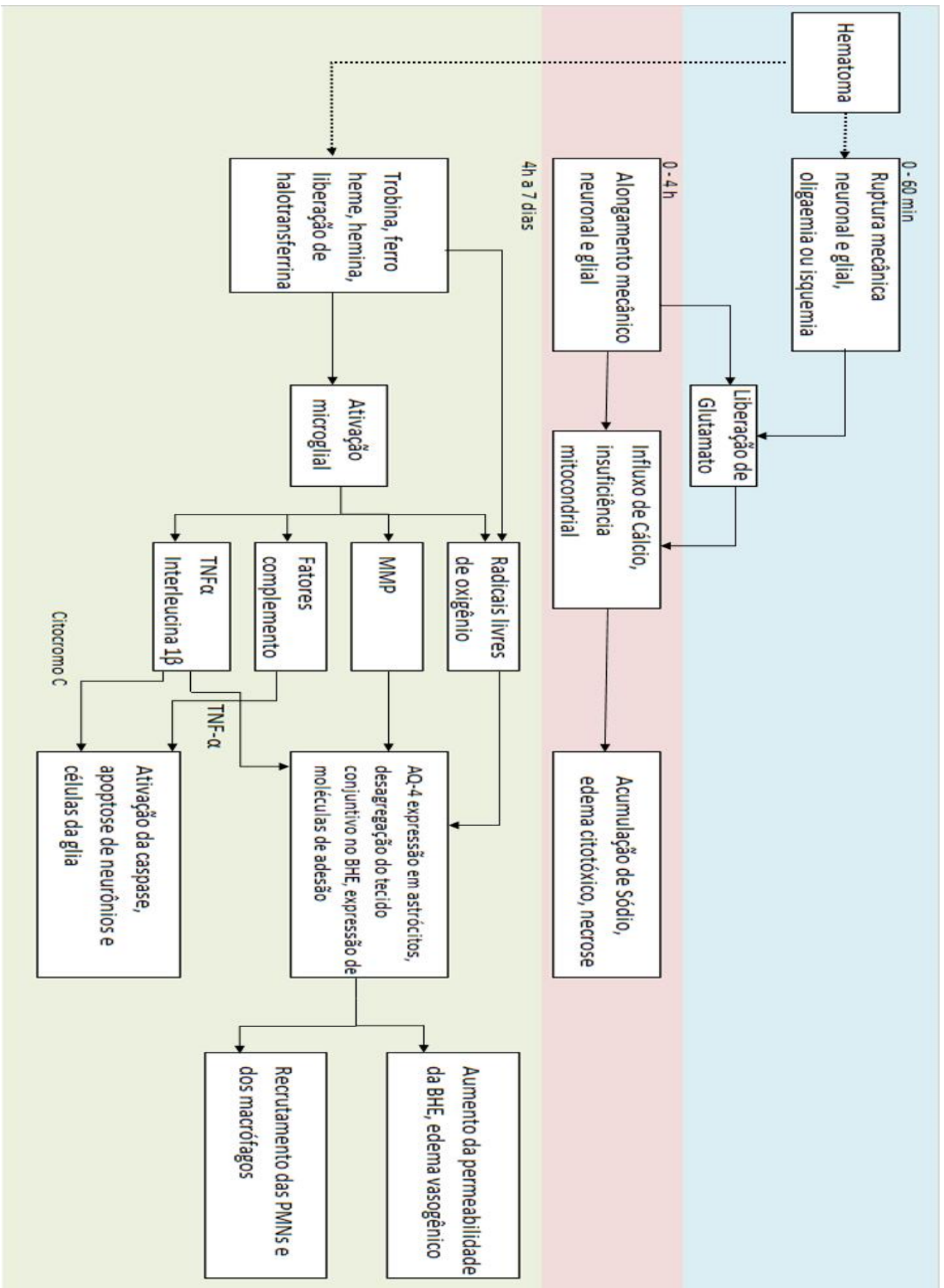
A lise de eritrócitos ocorre por vários dias após a HIC, que resulta de ou esgotamento das reservas de energia intracelular ou formação do complexo de ataque à membrana após a ativação do sistema de complemento, ou ambos. Essa lise também contribui para a formação do edema (XI *et. al.*, 2006).

Um dos elementos-chave para o desenvolvimento de edema cerebral começa com a reação inflamatória após a geração do hematoma. Leucócitos derivados do sangue, neutrófilos, em particular, infiltram-se no parênquima cerebral, resultando em um aumento da perturbação da barreira hematoencefálica, aumentando o edema cerebral, e, subsequentemente, a deterioração da função neurocomportamental (OKAUCHI *et. al.*, 2010).

Outras células inflamatórias, que igualmente estão envolvidas na lesão cerebral induzida pela HIC são os neutrófilos, danificando o tecido cerebral diretamente através da geração de espécies reativas de oxigênio e da secreção de proteases pró-inflamatórias (ARONOWSKI *et. al.*, 2011). Do mesmo modo, a introdução de componentes do sangue, incluindo trombina, hemoglobina, leucócitos e plaquetas para o cérebro, cria a base para uma lesão secundária em resposta à ativação da microglia e a neuroinflamação, resultando no recrutamento de leucócitos a um local normalmente privilegiado. Há estímulo para que os macrófagos liberem mediadores pró-

inflamatórios, potencializando a reação inflamatória. Diante dos fatos, a regulação da resposta inflamatória pode ser uma estratégia potencial para a terapia do HIC (WANG *et. al.*, 2007; HOU *et. al.*, 2012).

A ativação da microglia, células componentes do SNC, comumente encontrada nesse tipo de lesão, provavelmente tem dois papéis após HIC. Enquanto alguns processos microgliais podem ser benéficos, outros demonstraram desempenhar um papel na lesão secundária que ocorre após a HIC (TAYLOR *et. al.*, 2013). Um papel importante das células microgliais após a HIC é de fagocitar os detritos e os eritrócitos deixados no cérebro. Estes processos são mediados através de “receptores scavenger”, tal como CD36, na superfície de células. Eles também produzem citocinas pró-inflamatórias (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6) e quimiocinas (CXCL2), o que promove a neuroinflamação e o recrutamento de leucócitos derivados do sangue para o cérebro. Componentes do sangue ativam diretamente a microglia e iniciam respostas imunes. A ativação da microglia mediada pela trombina é induzida por sinalização da MAPK. Também tem sido relatado que os inibidores de p38 MAPK e os inibidores de c-JNK não apenas causada pela apoptose da microglia / macrófago, mas também por níveis muito reduzidos do TNF- $\alpha$  (HOU *et. al.*, 2012; TAYLOR *et. al.*, 2013).



**Figura 2:** Consequências patológicas da HIC. Adaptado de QUERESHI *et. al.*, 2009.

## 1.2. Quercetina (QU)

A quercetina (3, 3', 4', 5, 7- pentahidroxi-flavona) (**Figura 4**) é um flavonol (uma das seis subclasses dos flavonoides), presente em uma ampla variedade de plantas e alimentos, como cebolas, uvas, maçãs, cerejas, brócolis, e produtos derivados destes como sucos, chás e vinhos (BOOTS *et. al.*, 2008; DORA *et al.*, 2011). Os flavonoides são uma família de compostos derivados de plantas, com uma estrutura semelhante (3 anéis fenólicos e hidroxilas em anexo). As alterações da posição das hidroxilas é que dão origem aos subgrupos de flavonoides e aos diferentes compostos. Os flavonoides podem se apresentar de duas maneiras: como glicosídeos (grupo glicosil – açúcar – em anexo) ou aglicona (sem açúcar em anexo). Por definição, a quercetina é uma aglicona (VALÉRIO *et. al.*, 2009).

O glicosídeo quercetina ocorre quando um açúcar (como a glicose, a ramnose ou a rutinose) é anexado como um substituto para um grupo hidroxila, geralmente na posição 3 do anel fenólico. Esse grupo glicosil pode alterar a solubilidade, absorção e efeitos *in vivo*. Como regra geral, a presença de um açúcar aumenta a solubilidade da quercetina em água comparando com a aglicona, já que a quercetina aglicona é insolúvel em água fria, pouco solúvel em água quente e solúvel em álcoois e lipídeos. Sabe-se que a QU está presente em uma ampla classe de vegetais, principalmente na forma de glicosídeo QU. Porém, em cada vegetal, dependendo do glicosídeo ligado a sua cadeia principal e do local dessa ligação, ela recebe um nome diferente (Ex: isoquercetina, encontrada na manga). Já a QU aglicona é pobremente encontrada nos alimentos, exceto na cebola (GREGORY *et. al.*, 2009; YOUSEF *et. al.*, 2010).

A quercetina é estável no plasma humano, urina e água. Em condições básicas pode ocorrer instabilidade da quercetina devido à reatividade do anel central (C), resultando na fragmentação da estrutura do anel. A estrutura do anel central parece ser essencial para sua estabilidade (MOON *et. al.*, 2008) participando de reações para formar complexos com metais, desta forma, afetando o transporte, reatividade, biodisponibilidade e toxicidade dos íons metálicos. No seu esqueleto químico há três possíveis sítios de quelação de metais que competem entre si, e podem ser classificados da seguinte forma: catecol >  $\alpha$ -hidroxicarbonila >  $\beta$ -hidroxicarbonila (CORNARD *et. al.*, 2005).

Os flavonoides glicosilados quando ingeridos na dieta são resistentes a degradação pelo ácido clorídrico (HCl) no estomago, chegando intactos ao intestino delgado, lá as formas gliconadas são hidrolisadas pelas enterobactérias presentes no ceco e no cólon gerando as formas agliconadas que são absorvidas pelas células epiteliais por difusão simples (HOLLMAN *et. al.*, 1999; ERLUND, 2004). A quercetina glucosídeo também pode ser diretamente absorvida via o transportador de glucose dependente de sódio do tipo 1 (SGLT-1) ou excretada para o lúmen pela proteína de resistência multidroga do tipo 2 (MRP-2) (DORA, 2010). Após sua absorção facilitada pelo transportador SGLT-1, os glucosídeos de quercetina são hidrolisados por  $\beta$ -glucosidases intracelulares/citosólica (CBG) (NÉMETH *et. al.*, 2003). Outra enzima presente na membrana dos enterócitos, lactase (LPH), responsável pela hidrólise da lactose em glucose e galactose, possui uma atividade de hidrólise de formas gliconadas, liberando a forma agliconada que pode se difundir pela membrana e sofrer a metabolização celular. A hidrólise para a forma aglicona pelas bactérias ou pelos enterócitos é crucial para a eficiente absorção da quercetina glucosídeo pelo trato intestinal (DAY *et. al.*, 2000; NÉMETH *et. al.*, 2003).

Após a absorção, a quercetina é convertida em metabolitos conjugados antes de entrar em circulação. Os principais conjugados do flavonoide presentes no plasma são: 3'-O- $\beta$ -D-glucuronido de quercetina (Q3'GA) e 4'-O- $\beta$ -D-glucuronido de quercetina (Q4'GA), e ambos possuem considerável atividade (WILLIAMSON *et. al.*, 2005). Uma pesquisa que avaliou a absorção oral da QU, relata que esta variou desde 36,4 -53,0 %, e a meia-vida biológica era de 20-72h (WALLE *et. al.*, 2001). Especula-se que o aumento da QU no plasma seja variável entre os indivíduos, e que quando a QU é consumida com grande quantidade de lipídeos, por ser lipossolúvel, ela seja absorvida mais facilmente (GREGORY *et. al.*, 2009). No entanto, um dos maiores problemas para a administração da QU é a sua baixa biodisponibilidade oral. Por assim ser, a QU sofre diversas reações de conjugações que geram um misto de compostos que muitas vezes não possuem o efeito esperado pela QU. Um exemplo são dois de seus principais metabolitos, quercetina-3'-sulfato e 3'-metil-quercetina-3-glicurônico, que demonstraram não serem efetivos em uma das principais funções dos flavonoides, a antioxidante (DORA, 2010).

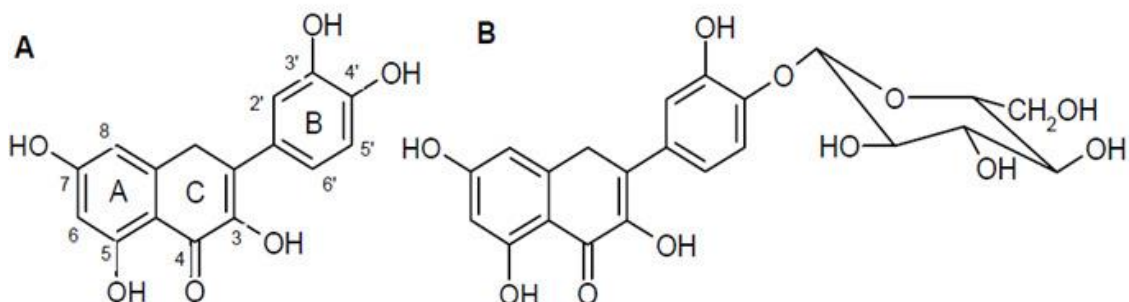
Quanto à distribuição nos tecidos, recentes estudos observaram concentrações de quercetina nos pulmões, testículos, rins, timo, coração, fígado (BISCHOFF, 2008).

Como a maioria dos trabalhos usam a quercetina na sua forma agliconada, é difícil encontrar relatos que citam a quercetina detectada no cérebro, porém trabalhos têm citado a capacidade da quercetina em atravessar a barreira hematoencefálica (YOU DIM *et. al.*, 2004; RANGEL-ORDÓÑEZ *et. al.*, 2010). Além disso, estudos *in vitro* indicam que a QU tem uma absorção rápida pelas células, resultando em significativa acumulação intracelular (EGERT, *et. al.*, 2008; JIN *et. al.*, 2010). Há também absorção significativa de QU pelas mitocôndrias, dando a ideia de que a QU pode estar armazenada na mitocôndria e liberada quando for preciso. Tomando como um todo, pesquisas sugerem que a quercetina e seus metabolitos tendem a acumular-se nos órgãos envolvidos no seu metabolismo e excreção (fígado, rins e principalmente pulmões), e que talvez a mitocôndria possa ser uma área de concentração de quercetina dentro das células (LI *et. al.*, 2009).

Após a absorção os flavonoides na sua forma livre ou glicosilada são metabolizados em glucoronidato ou sulfato conjugado. Esses metabólitos circulam no sangue sendo excretados na bile e urina como glucoronidato e sulfato conjugado em até 48h. Posteriormente, é degradada pelas bactérias intestinais em ácido fenólico, ácido 3-hidroxifenilacético e ácido 3,4-dihidroxifenilacético dentro do anel B (MUROTA *et. al.*, 2003; DORA, 2010). Além disso, a quercetina e seus metabólitos podem sofrer fermentação microbiana no colón, gerando ácidos fenólicos e CO<sub>2</sub>, que são excretados na respiração (ABRAHAMSE *et. al.*, 2005).

A baixa biodisponibilidade da quercetina e altas concentrações dos metabolitos indicam que ocorre metabolismo de primeira passagem no fígado e intestino, e a alta concentração da quercetina conjugada observada na bile, corroboram para um potencial de recirculação entero-hepático (ADER *et. al.*, 2000; OLIVEIRA *et. al.*, 2002; LIU *et. al.*, 2003). Manach e colaboradores em 2005 ao revisar 97 estudos de biodisponibilidade relatam que temos uma grande variação destes dados, visto que de um flavonoide para outro ocorre diferenças de absorção, disponibilidade e excreção (MANACH *et. al.*, 2005). Por exemplo, nesta revisão foi demonstrado que ao ingerir em média 50 mg de quercetina na forma aglicona temos uma concentração plasmática de 0 a 4 µmol/L. Já Walle (WALLE *et. al.*, 2001) encontrou que após uma ingestão oral de 100 mg de quercetina na forma aglicona a concentração plasmática de 890 nmol/L após 30 minutos e 1160 nmol/L após 8 horas.

Quanto a toxicidade, a quercetina é bem tolerada e reconhecida como segura em doses orais de até 1000 mg/dia ou em uma dosagem de 756 mg/dia via intravenosa (HARWOOD *et. al.* 2007).



**Figura 4:** Estrutura química da quercetina (A) e da quercetina 4'-  $\beta$ -D-glucosídeo (B)  
Adaptada de Dora CL, 2010.

Estudos descrevem que esse composto possui efeitos antioxidantes devido as suas propriedades sequestrantes de radicais livres e por quelar íons metálicos, protegendo assim os tecidos dos radicais livres e da peroxidação lipídica. A propriedade antioxidante é direcionada sobre o radical hidroxila ( $\bullet$ OH) e o radical ânion superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), que são espécies altamente reativas envolvidas na iniciação da peroxidação lipídica (AZZINI *et. al.*, 2010; AHMAD *et. al.*, 2011). Além disso, há elementos estruturais presentes na QU característicos de funções antioxidantes: (1) as duas hidroxilas em posição orto no anel B – grupo catecol, (2) a presença da dupla ligação entre o C2 e C3 (SILVA *et. al.*, 2002).

Além destes efeitos importantes, os flavonoides têm propriedades estabilizadoras de membrana, podendo afetar alguns processos do metabolismo intermediário (AHMAD *et. al.*, 2011). Ainda, esse composto possui atividade na inibição da COMT (catecolamina-O-metil transferase), inibindo a degradação de aminas vasoconstritoras, aumentando o tônus e a resistência capilar. Outro mecanismo de ação proposto é a diminuição da produção de histamina, ou por inibição das enzimas descarboxilase e fosfolipase, ou pela diminuição da liberação da histamina pela estabilização das membranas dos mastócitos e basófilos (SANCHARI *et. al.*, 2008). Outros efeitos como



antitumorais, antivirais e protetor gástrico e hepático são igualmente descritos na literatura (AHMAD *et. al.*, 2011).

Um estudo realizado *in vivo*, para descrever os efeitos da quercetina na isquemia cerebral focal por oclusão da artéria média (MCAO) em ratos *Wistar*, revelou que esse composto é um poderoso antioxidante, podendo impedir o acúmulo de radicais livres e danos oxidativos e demonstrando ter um valor terapêutico no tratamento do AVC isquêmico (GREGORY *et. al.*, 2009).

Além disso, este composto tem atraído considerável atenção por parecer promissor para a terapia e prevenção de doenças cardíacas e também para a diminuição da incidência de AVC (PASHEVIN *et. al.*, 2011). No entanto, devido ao fato de a quercetina ser pouco solúvel e possuir baixa biodisponibilidade é necessário o desenvolvimento de uma forma farmacêutica adequada, que assegure a absorção deste composto no organismo, especialmente através da barreira hemato-encefálica (AHMAD *et. al.*, 2011).

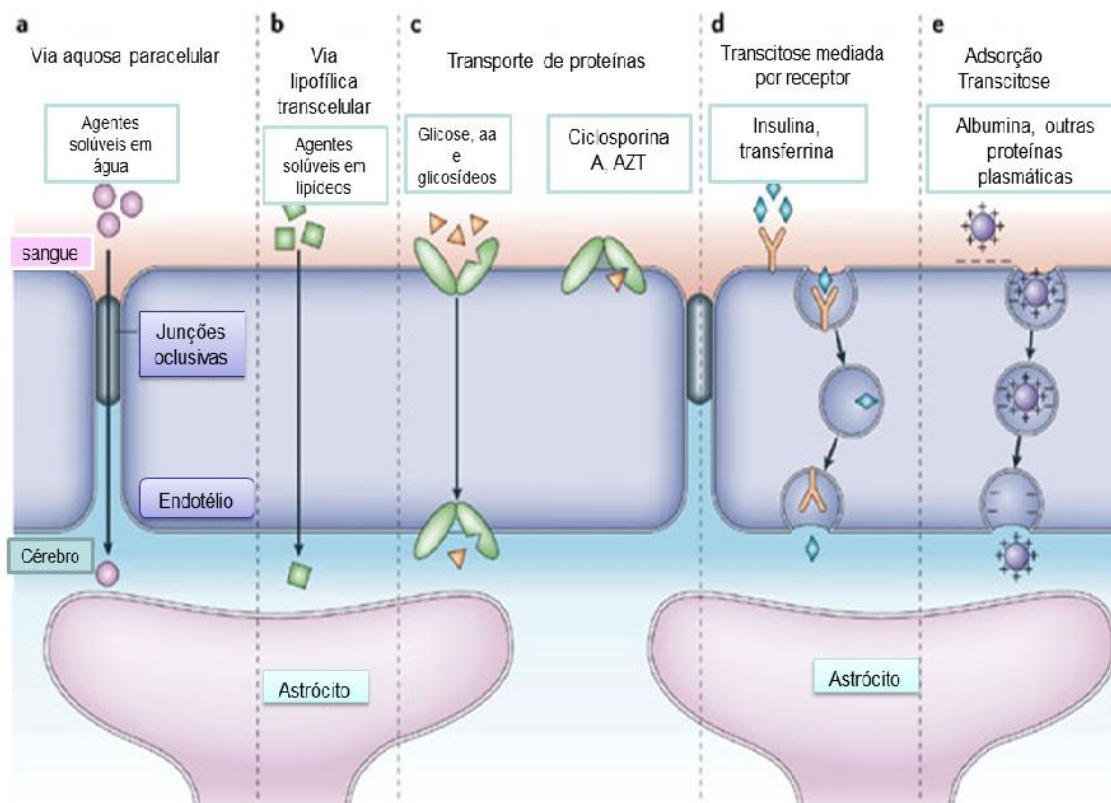
### **1.3. Transporte de fármacos através da barreira hematoencefálica pós HIC**

O transporte de fármacos pela barreira hematoencefálica (BHE) é um obstáculo no desenvolvimento de potenciais agentes terapêuticos que atuem no cérebro. O SNC é protegido pela BHE, que controla a entrada de compostos no cérebro, regulando assim a homeostase cerebral. A BHE (**Figura 5**) é uma monocamada de células endoteliais associadas à pericitos e aos astrócitos, que separam o parênquima cerebral do sistema circulatório, restringindo o acesso às células do cérebro de compostos vindos pelo sangue, como toxinas, patógenos, etc. Apenas moléculas com tamanho menor que 5.000 Daltons, lipofílicas e eletricamente neutras, conseguem difundir passivamente através da BHE. Portanto, várias estratégias estão sendo desenvolvidas para melhorar a quantidade e concentração de compostos terapêuticos no cérebro (ALVAREZ-ROMAM *et. al.*, 2001; COUVREUR *et. al.*, 2002; FATTAL *et. al.*, 2002).

Como demonstrado na **Figura 3**, a BHE é um importante componente da rede de comunicação que conecta o sistema nervoso central e os tecidos periféricos, além de funcionar como uma interface que limita e regula a troca de substâncias entre sangue e o sistema nervoso central (BANKS, 2010). A impermeabilidade da BHE é o resultado de

uma série de características únicas, que acrescenta dificuldade a moléculas tentando penetrar nesta barreira. Esta propriedade é baseada na existência de uma permeabilidade muito restrita do endotélio, além da existência de enzimas degradantes presentes em grande número no interior do endotélio de modo que, com exceção de água, gases como oxigênio e o dióxido de carbono e determinadas moléculas lipossolúveis muito pequenas podem passar de forma íntegra (BANKS, 2010). Moléculas que são essenciais para o metabolismo do cérebro tais como íons, glicose, aminoácidos e componentes de ácido nucléico, passam pela BHE através de canais especializados (CARDOSO *et. al.*, 2010). Já o transporte de moléculas hidrofílicas, tais como peptídeos e proteínas que não têm um sistema de transporte específico é muito mais lento do que as moléculas lipofílicas, no entanto, as quantidades que atravessam a BHE podem ser suficientes para causar um efeito mediado por receptores nos neurônios. Alguns tipos especiais de proteínas ou peptídeos como hormônios periféricos e peptídeos regulatórios que exercem sua ação no cérebro geralmente têm sistemas especializados de transporte saturável em toda a BHE. Desta forma a BHE se torna altamente restritiva, mas de qualquer forma pode ser incapaz de impedir a passagem de alguns toxinas e agentes terapêuticos da corrente sanguínea para o cérebro (MEHDIPOUR *et. al.*, 2009). Além das funções de permeabilidade seletiva a BHE possui aspectos importantes como funções neuroimune, incluindo a secreção de citocinas, prostaglandinas e óxido nítrico. A BHE pode receber o estímulo de um compartimento (p.ex. o sistêmico) e, simultaneamente, responder com secreções para o outro (p.ex. o sistema nervoso central), sendo esta função de papel central na resposta neuroimune. Por exemplo, LPS aplicado na superfície das células do cérebro abluminal endotelial estimula a secreção de IL-6 a partir de sua superfície luminal (PARDRIDGE *et. al.*, 2005, CARDOSO *et. al.*, 2010).

Em um estudo realizado pela base de dados da Comprehensive Medicinal Chemistry foi demonstrado que de aproximadamente 7.000 fármacos analisados, apenas 5% dessas substâncias alcançaram de forma eficiente o SNC (WONG *et. al.*, 2012). Contudo, sabe-se que a HIC é sempre seguida por rompimento da BHE, o que contribui para o aumento da permeabilidade de fármaco ao cérebro e, por conseguinte, para o aumento do edema cerebral (KEEP *et. al.*, 2008; WU *et. al.*, 2011).



**Figura 5:** Estrutura e transporte através da BHE. Adaptado de Löscher *et. al.*, 2005.

Apesar da desestruturação da BHE pós HIC, existem locais em que a BHE permanece intacta, assim o desenvolvimento de formas farmacêuticas convencionais pode resultar em falha no tratamento. Nesse sentido, utilização da nanotecnologia para vetorização de fármacos para o SNC pode contribuir para a entrega do fármaco tanto nos locais de maior permeabilidade como em locais onde a BHE continua intacta, podendo evitar o agravamento da lesão (GABATHULER, 2011). Em vista disso, o nanoencapsulamento de fármacos vem como uma alternativa para facilitar a entrada de compostos terapêuticos no SNC.

#### 1.4. Nanocarreadores de fármacos

Atualmente, a nanotecnologia é um dos principais focos das atividades de pesquisa, desenvolvimento e inovação em todos os países industrializados do mundo. Ela refere-se às tecnologias em que a matéria é manipulada às escalas atômica e molecular para criar novos materiais e processos com características funcionais diferentes dos materiais comuns (BURGESS *et. al.*, 2010; BOISSEAU *et. al.*, 2011).

A área da nanotecnologia que estuda as ciências da vida é conhecida como nanobiotecnologia ou nanomedicina e apresenta várias áreas de atuação. No setor farmacêutico, a área que tem recebido grande investimento está relacionada ao desenvolvimento de nanocarreadores de fármacos, especialmente para o tratamento de doenças como câncer, doenças inflamatórias, infecciosas e cardiovasculares, pois muitas moléculas exibem problemas de instabilidade nos fluídos biológicos, baixa solubilidade aquosa e/ou baixa capacidade de permeação através das membranas plasmáticas, o que leva a uma biodisponibilidade insuficiente assim como flutuações da concentração plasmática, causando falta de efeito terapêutico ou toxicidade. Desta forma, muitos esforços têm sido despendidos para desenvolver carreadores de fármacos que possam contornar esses problemas (COUVEUR *et. al.*, 1995; BARRATT, 2000; MEHNERT E MADER, 2001; BOISSEAU *et. al.*, 2011; SZELENYI, 2012).

As principais vantagens dos sistemas de liberação nanoestruturados frente aos convencionais são: (i) maior eficácia terapêutica, com liberação progressiva e controlada do fármaco, (ii) diminuição significativa da toxicidade e maior tempo de permanência na circulação, (iii) aumento da solubilidade para fármacos lipofílicos, (iv) proteção do fármaco contra instabilidade e decomposição durante o trânsito no corpo até o local de ação e também durante armazenamento do medicamento, (v) administração segura e em menor número de doses e (vi) direcionamento a alvos específicos (TEDESCO *et. al.*, 2007).

Existem muitos tipos de nanocarreadores, dentre eles, os nanocarreadores lipídicos têm sido alvo de muitos estudos nos últimos anos, em função da sua alta biocompatibilidade. Estes nanocarreadores podem ser constituídos de lipídios sólidos (nanopartículas lipídicas sólidas) ou líquidos (nano e microemulsões), ou por misturas destes (carreadores lipídicos nanoestruturados), levando a produção de sistemas matriciais ou reservatórios que exibem uma ampla faixa de tamanhos de partículas, ainda na escala nanométrica (HAUSS, 2007; BRUXEL *et. al.*, 2012).

As nanoemulsões (NE) podem ser definidas como sistemas heterogêneos composto de dois líquidos imiscíveis, sendo que um líquido se encontra disperso sob a forma de gotículas no outro, e o sistema é estabilizado por tensoativos adequados. A sua formação geralmente requer uma fonte de energia e a dispersão é termodinamicamente instável. Elas podem ser do tipo óleo em água (o/a) ou água em óleo (a/o), sendo que as

gotículas em geral apresentam diâmetro inferior a um micrômetro (geralmente entre 10 e 500 nm) (CONSTANTINIDES *et. al.*, 2008; WANG *et. al.*, 2009; BRUXEL *et. al.*, 2012).

Dentre os sistemas de liberação lipídicos disponíveis no mercado, as nanoemulsões óleo em água são os sistemas que foram mais desenvolvidos. O aumento da biodisponibilidade de fármacos hidrofóbicos quando incorporados em nanocarreadores lipídicos parece estar relacionado com a vantagem de manter o fármaco dissolvido em um elevado grau de dispersão, a qual aumenta a área contato, resultando em uma absorção mais reprodutível e uniforme. Além disso, devido ao tamanho de partícula reduzido, uma grande área superficial é produzida, fazendo com que a enzima lipase pancreática hidrolise os lipídios mais rapidamente, acelerando a taxa de liberação do fármaco e/ou a formação de micelas mistas contendo o mesmo, tornando-o assim mais prontamente disponível para absorção. Além disso, outras vantagens das nanoemulsões incluem a possibilidade de produção em grande escala e o aumento da estabilidade física (ausência dos fenômenos cremação, floculação, coalescência e sedimentação) quando comparado a emulsões ou macroemulsões grosseiras (MEHNERT e MÄDER, 2001; CONSTANTINIDES *et. al.*, 2008 CHAKRABORTY *et. al.*, 2009; BRUXEL *et. al.*, 2012).

Recentemente, foi demonstrado que a incorporação de QU de sistemas de liberação lipídicos, foi capaz de melhorar a biodisponibilidade e/ou a eficácia terapêutica deste composto. A atividade anti-inflamatória de uma microemulsão (ME) contendo QU desenvolvida por DORA e colaboradores (2010) foi avaliada em modelo experimental de asma alérgica em camundongos. Neste estudo foi observado que o grupo tratado com microemulsão por via oral apresentou uma melhor resposta anti-inflamatória do que o grupo tratado com a QU livre, em suspensão. Quando o plasma dos animais foi avaliado, metabólitos ativos da QU foram encontrados somente no grupo tratado com a microemulsão. Estes dados sustentam fortemente as propriedades da QU-ME como sistema de liberação eficaz e capaz de melhorar a biodisponibilidade oral do presente flavonoide (ROGERIO *et. al.*, 2010).

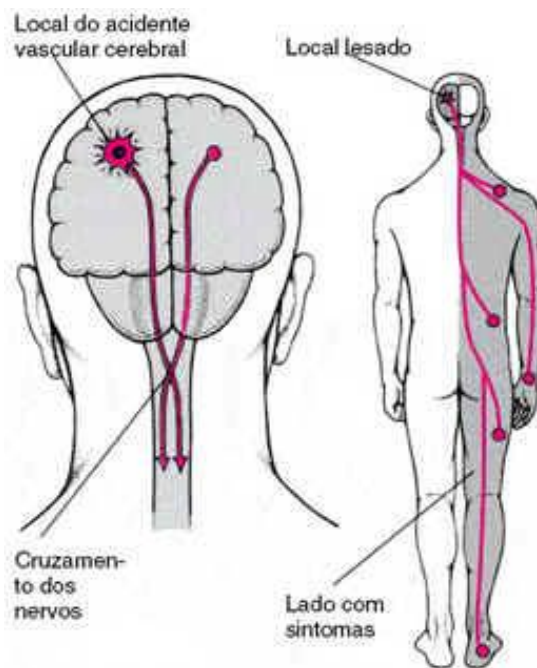
Para o tratamento de patologias no cérebro, Ghosh e colaboradores em 2013 realizou um estudo com nanopartículas poliméricas contendo quercetina para tratamento de AVC isquêmico em um modelo de isquemia-reperusão por oclusão das carótidas.

Eles realizaram um tratamento pré insulto isquêmico e seguiram por três dias pós AVC. O tratamento foi feito em ratos jovens e idosos, com quercetina nanoencapsulada por via oral. Foi descrito um aumento substancial na peroxidação lipídica, diminuição das atividades de enzimas antioxidantes, de ambos os grupos de animais resultantes da indução da isquemia. Também diminuiu microviscosidade da membrana mitocondrial e aumentou a geração de espécies reativas de oxigênio (ERO) em diferentes regiões do cérebro dos animais estudados. No entanto, observou-se que o tratamento oral de quercetina nanoencapsulada resultou na regulação negativa de iNOS e na atividade da caspase-3 e uma melhor contagem neuronal no hipocampo. Além disso, o formulação transmitiu um nível significativo de proteção no estado antioxidante em diferentes regiões do cérebro (GHOSH *et. al.*, 2013).

### **1.5. Relação ICH e comportamento:**

O modelo experimental animal utilizado mimetiza algumas características elementares do estado patológico da ICH, favorecendo sua compreensão e o desenvolvimento de terapias eficazes, por fornecer uma aproximação aos complexos fatores relacionados à patologia. Metodologias no âmbito comportamental permitem estudar e avaliar diversas características físicas resultantes da patologia estudada. Sabe-se que as alterações físicas resultantes da ICH vão depender da natureza, do local cerebral acometido e da gravidade, principalmente (MERGENTHALER *et. al.*, 2012). Paralisia, fraqueza muscular, percepção reduzida da posição do corpo e consciência sensorial são sintomas comuns pós ICH. Ainda assim, há que se considerar o lado do cérebro que ocorreu o AVC, devido ao fato de que um lado do cérebro controla o lado oposto do corpo (**Figura 6**) (IDEACOLA *et. al.*, 2011).

Nesse sentido, a utilização de testes comportamentais que visem a quantificação dos prejuízos motores pós AVC são de extrema importância no estudo de compostos que possam ser utilizados como tratamento para essa patologia. Exemplos de testes utilizados para este fim são: Teste em haste elevada, teste de motricidade em grade e campo aberto (GOLDSTAIN *et. al.*, 2012).



**Figura 6:** Hemicorpo afetado pós AVC: Relação inversa ao lado cerebral afetado. Retirado de DAVIES, 1996.

O teste em haste elevada mede principalmente déficits de equilíbrio e locomoção. O animal necessita de habilidades motoras para a conclusão do teste (GOLDSTAIN *et. al.*, 1990). Perda de equilíbrio é um sintoma recorrente em pacientes pós AVC, devido principalmente a falta de controle muscular de um hemicorpo, fazendo com que tarefas como a marcha, a manutenção na posição sentada tornem-se difíceis de serem executadas (LINCOLN *et. al.*, 1999; JÖNSSON *et. al.*, 2008).

A assimetria de coordenação dos membros é igualmente um sintoma comum em pacientes pós AVC. Essa tarefa é avaliada em modelos animais de ICH, por exemplo, pelo teste de motricidade em grade. Nesse teste se quantifica a diferença no controle motor entre os membros dos hemicorpos direito e esquerdo (SCHAAR, *et. al.*, 2010).

Da mesma forma, a locomoção estará prejudicada após lesão, devido a diversos fatores já mencionados. Pacientes hemiparéticos apresentaram diminuição de contração de diversos músculos posturais. Desta forma pode-se supor que após uma lesão encefálica, tanto os movimentos voluntários de membros como a atividade muscular estabilizadora proximal encontram-se comprometidos, comprometendo a marcha

(PEPPEN *et. al.*, 2008). A locomoção em animais pós AVC pode ser medida pelo teste de campo aberto, que quantifica, durante 5 minutos o nível de locomoção do animal (HARTMANA *et. al.*, 2009). Em seres humanos, teste semelhante, denominado “teste de marcha” é realizado para auxílio do tratamento pós AVC (DAVIES, 1996).

Por fim, não encontramos na literatura estudos que avaliem o efeito farmacológico do uso de nanocarreadores para tratamento de HIC, evidenciando a originalidade deste trabalho. Diante do exposto, neste trabalho avaliamos o possível papel protetor da quercetina, um composto com reconhecidas atividades antioxidantes, tanto na sua forma livre como incorporada em um nanocarreador lipídico, com intuito de reduzir as consequências patológicas causadas pela HIC.



## 2. OBJETIVOS:

### **2.1.Objetivo geral:**

Investigar o efeito do tratamento com a quercetina na forma livre e encapsulada em nanoemulsões, em um modelo de hemorragia intracerebral em ratos.

### **2.2.Objetivos específicos:**

- Analisar se a hemorragia intracerebral causa possíveis alterações motoras nos animais e se a quercetina livre e nanoencapsulada são capazes de alterar essas possíveis mudanças comportamentais;
- Investigar a influência da quercetina livre e nanoencapsulada na alteração de peso corporal causada pela hemorragia cerebral;
- Investigar a influência da quercetina livre e nanoencapsulada no tamanho do hematoma gerado;
- Investigar a influência da quercetina livre e nanoencapsulada sobre a capacidade antioxidante total e sobre os compostos antioxidantes GSH e GST;
- Investigar a influência da quercetina livre e nanoencapsulada sobre a peroxidação lipídica.

**Manuscrito**

**Manuscrito a ser submetido ao periódico Pharmacological Research.**

**Protective role of free and quercetin-loaded nanoemulsion against damage induced by intracerebral hemorrhage in rats.**

Aline Ribeiro Galho<sup>1</sup>, Suellen de Azevedo Ribeiro<sup>2</sup>, Marcos Freitas Cordeiro<sup>2</sup>, Magno da Silva Marques<sup>2</sup>, Débora Camacho Luz<sup>2</sup>, Gabriela Hädrich<sup>3</sup>, Juliane Ventura Lima<sup>1</sup>, Cristiana Lima Dora<sup>3,4</sup>, Ana Paula Horn<sup>1,2\*</sup>.

<sup>1</sup>Programa de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas - Fisiologia Animal Comparada,

<sup>2</sup>Laboratório de Histologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Rio Grande (FURG), Rio Grande, RS, 96210-900, Brazil.

<sup>3</sup>Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde.

<sup>4</sup>Laboratório de Nanotecnologia Aplicada à Saúde, Universidade Federal do Rio Grande (FURG), Rio Grande, RS, 96203-900, Brazil.

Corresponding author:

Ana Paula Horn - Laboratório de Histologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Rio Grande (FURG) – Av Itália, Km 8 - Rio Grande, RS, 96210-900, Brazil. Phone number: +55 53 3293 5185. Fax number: +55 53 3293-6848.

e-mail: anapaulahorn@pq.cnpq.br

## ABSTRACT

Intracerebral hemorrhage (ICH) is a major public health problem, which leads to high rates of death and disability in adults. Experimental studies have shown that oxidative stress plays an important role in the pathogenesis of intracerebral hemorrhage and could represent a target for treatment. However, the difficulty of administering compounds to the central nervous system (CNS), because of the blood brain barrier (BBB), is an obstacle to be overcome. This study compared the effects of a nanoemulsion containing quercetin with the free form of the drug in a collagenase-induced ICH model in rats. Quercetin (QU) is a polyphenol that has antioxidant effect *in vitro* but due to its high lipophilicity has low bioavailability *in vivo*. Thus, systems for drug delivery are presented as an alternative to the administration of this compound, as they allow for increased absorption at the site of action for a long time. In this work animals submitted or not to ICH were treated with a single intraperitoneal QU dose (free or nanoemulsion) of 30 mg/kg. To test their motor performance the behavioral tests evaluated were the open field, the foot fault and the beam walking. Seventy-two hours after surgery the size of the hematoma was evaluated and biochemical measurements (GCL activity, GSH content, TBARS and ACAP) were performed. Animals receiving the nanoemulsion containing QU (QU-N) had a significant improvement in the score of beam walking and the open field tests. Also, QU-N was able to reduce the size of the hematoma, preserve the activity of GST, increasing GSH content and antioxidant capacity. QU-SP influenced only the open field test, the content of GSH and increased antioxidant capacity. Thus, it can be observed that QU presented antioxidant activity in both forms administered, but its incorporation into nanoemulsions seems to increase its bioavailability and consequently enhance the antioxidant effect, reflecting the improvement of motor deficits and the decrease in hematoma size in a model of ICH in

rats. These results suggest that the nanoemulsion containing QU developed in this study may be promising for the treatment of ICH.

Keywords: quercetin, nanoemulsion, intracerebral hemorrhage, locomotory activity, antioxidant responses.

## 1. INTRODUCTION

Intracerebral hemorrhage (ICH) is a common subtype of stroke and in many cases is fatal or produces severe neurological deficits to survivors<sup>1</sup>. It occurs when a blood vessel disrupts, pouring out blood to brain parenchyma, commonly due to high blood pressure. It has a high mortality rate: 30-50% of the patients die within the first 30 days. From those who survive only 20% recover independence within six months<sup>2</sup>.

The main pathological consequences of ICH are the formation of a hematoma, which expands for hours or even days; the edema formation in the affected region, which initiates right after the vessel rupture and increases up to days after the lesion; the massive death of neurons and glial cells in the affected region and the glial activation in the perihematoma region which is responsible for intense local inflammatory response<sup>3,4</sup>.

The World Health Organization highlights the stroke and other cerebrovascular diseases as the second cause of death in the world, being responsible in 2008 for 10,8% of all deaths<sup>5</sup>. The incidence of stroke after 55 years of age doubles every decade, having a prominent position among elderly population. The general prevalence in world population is estimated in 0,5% to 0,7%. Despite recent progress in researches, there is no specific pharmaceutical treatment for ICH nowadays<sup>6</sup>. Based on the explained epidemiologic scenario, as well as on a considerable sociodemographic context such as the increase of life expectancy and consequentially the population aging, increasing risk factors and dimensioning even more its challenge, it is necessary to search strategies capable of acting efficiently in the damages caused by this pathology<sup>7</sup>.

Only half the ICH patients survives, and they will possibly suffer from significant brain atrophy and neurological deficits throughout their lives. The most affected brain area by ICH are the basal ganglia, more specifically the striatum<sup>3</sup>. This

area of the brain executes functions related to active movement, preparation or initiation of behavioral responses, responses to visual stimuli and processing of information connected to motor responses<sup>8</sup>.

Quercetin (3,3',4',5,7-pentahydroxi-flavona) (QU) belongs to polyphenolic bioflavonoids class and is largely found in the diet and its main sources are tea, onions, apples and red wine. It is known for its already described antioxidant activity, as a strong scavenger of free radicals and for presenting anti-inflammatory properties<sup>9</sup>. Other effects such as antitumoral, antiviral, gastric and hepatic protector are described in the literature<sup>10</sup>. Despite its promising in future therapies, an important drawback in the administration of this substance is its low oral bioavailability, due to its lipophilicity<sup>11</sup>. For this reason, it is necessary the development of alternatives which can make QU feasible to be used in the treatment of several pathologies which can benefit from its pharmacological properties<sup>12</sup>.

In recent years, the development of colloidal drug delivery system, such as nanoemulsions, has been proposed to improve the absorption and therapeutic index of several drugs. Nanoemulsions are composed of vegetal, synthetic, or semi-synthetic oils that are very often stabilized by phospholipids as the main surfactant. The dispersed phase generally lipophilic, act as a potential reservoir of lipophilic drugs, which in contact with semi permeable membranes can facilitate the transport of drugs through these barriers<sup>13, 14</sup>.

Taken together the reasons exposed above, this work aimed to investigate a possible therapeutic effect of free and nanoemulsion of QU in a model of ICH in rats.

## **2. MATERIAL AND METHODS**

### **2.1. Materials**

Quercetin (QU), 12-hydroxystearic acid–polyethylene glycol copolymer (PEG 660-stearate/Solutol HS15<sup>®</sup>) and castor oil (CO) were purchase from Sigma–Aldrich (Missouri, USA). Carboxymethylcellulose (CMC) was purchased from Natural Pharma (São Paulo, Brazil). Hydrogenated soybean lecithin (SbPC/Lipoid S75-3N) was purchased from Lipid (Ribeirão Preto, Brazil). Ethanol, acetone, methanol were purchased from Sigma–Aldrich (Missouri, USA) and were analytical reagent grade.

### **2.2. Preparation of quercetin suspension and quercetin nanoemulsion**

The QU nanoemulsion was prepared by a hot solvent diffusion method associated to phase inversion technique (PIT)<sup>15</sup>. Briefly, a solution containing QU, castor oil and lecithin in acetone: ethanol (60:40, v/v) at 60 °C was added an aqueous phase containing surfactant PEG 660-stearate previously heated at 80 °C, under magnetic stirring, at 700 rpm. The resulting colloidal suspensions were then cooled to room temperature, the organic solvent was evaporated under reduced pressure, and the final volume was adjusted to 20 mL. Finally, the colloidal suspensions were filtered through an 8 µm filter paper. The formulations tested can be observed in Table 1 and they were made in triplicates. For the preparation of QU-loaded nanoemulsion, the drug was added to the organic phase of the formulation. The free quercetin (QU-SP) was administered in a suspension form and was prepared by adding QU in aqueous carboxymethylcellulose dispersion (0.5%) in order to obtain a final QU concentration equal to nanoemulsion<sup>16</sup>.



### **2.3. Size and zeta potential measurements**

The particle size and zeta potential of the nanoemulsions were determined by light scattering and laser-doppler anemometry, respectively, using a Zetasizer Nano Series (Malvern Instruments, Worcestershire, UK). The particle size measurements were performed at 25 °C after appropriate dilution of the samples in distilled water. Each size analysis lasted 300 s and was performed with an angle detection of 90°. The hydrodynamic radius was determined using Stokes-Einstein's equation,  $R = (\kappa_B T / 6\pi\eta D)$  where  $\kappa_B$  is Boltzmann's constant (J/K), T is the temperature (in K), D is the diffusion coefficient and  $\eta$  is the viscosity of the medium – water in this case ( $\eta = 0.89$  cP at 25°C). For measurements of zeta potential, the samples were placed in the electrophoretic cell, where a potential of  $\pm 150$  mV was established. The zeta potential values were calculated as mean electrophoretic mobility values using Smoluchowski's equation.

### **2.4. Transmission Electron Microscopy**

Drops of the nanoemulsion (diluted 1000x in ultrapure Milli-Q® water) were deposited on carbon-coated copper grids and stained with 2% uranyl acetate. According to the procedure described elsewhere<sup>17</sup> specimens for cryo-TEM were prepared by quench-freezing thin liquid films of the dispersions into liquefied ethane (-171 °C). They were mounted in a Gatan 626 cryoholder cooled with liquid nitrogen and transferred to the microscope. The specimens were observed at low temperature (-180 °C), using a Philips CM200 `Cryo` microscope operating at 80 kV. A low-dose procedure was used to reduce radiation damage in the areas of interest before actual image recording on Kodak SO163 films.

## 2.5. Determination of QU concentration in the nanoemulsions by HPLC

### Instruments and analytical conditions

The HPLC analysis was performed using a Shimadzu LC-20AD system (Kyoto, Japan) equipped with a LC-20AT pump, SPD-20A UV detector, CMB-20A system controller, CTO-20AC column oven, and the sample injection was performed through a Rheodyne 7125 valve with a 20  $\mu\text{L}$  loop. The detector was set at 369 nm and peak areas were integrated automatically by computer using a LC solution® software program. The experiments were carried out using a reversed-phase Zorbax ODS (Agilent Technologies, Wilmington, DE, USA) C18 column (150 mm x 4.6 mm I.D., with a particle size of 5  $\mu\text{m}$ ), maintained at  $40 \pm 1$  °C. The mobile phase consisted of a 1 % phosphoric acid:methanol mixture (45:55 v/v; pH 2.7) and was eluted isocratically at a flow rate of 1 mL min<sup>-1</sup>.

The HPLC method was validated according to the ICH<sup>18</sup> using of the following parameters: specificity, linearity, accuracy, precision, and determination of the limits of detection (LOD) and quantification (LOQ). The calibration graph for QU was linear over the range of 0.25 to 10  $\mu\text{g mL}^{-1}$  ( $r^2=0.9997$ ). The regression equation of the media calibration graph ( $n = 3$ ) was  $y = 97397x+542.58$ . The variance analysis (ANOVA) confirmed the linearity of the method ( $F_{\text{caln}} > F_{\text{critical}}$ ;  $P=0,05$ ). The detection limit and quantification limits were 0.0670 $\mu\text{g/mL}^{-1}$  and 0.2030 $\mu\text{g/mL}^{-1}$  respectively, indicating that the method was sufficiently sensitive to be used to determine the QU content in the colloidal suspensions. The recovery values were ranged from 97.0 to 103% satisfying the acceptance criteria for accuracy in this study. The intra-day and inter- day relative standard deviation values were lower than 3%, indicating an acceptable variability of the QU content determination ( $P < 0.05$ ).

## **2.6. QU content determination and nanoemulsion recovery**

The QU content and recovery in the nanoemulsion was determined by HPLC. The HPLC analysis was performed using a Shimadzu LC-10A system (Kyoto, Japan) equipped with a LC-10AD pump, SPD-10AVVP UV detector, SCL-10AVP system controller, DGU- 14A degasser, CTO-10ASVP column oven, and the sample injection was performed through a Rheodyne 7125 valve with a 20  $\mu$ L loop. The detector was set at 369 nm and peak areas were integrated automatically by computer using a Shimadzu Class VP® V 6.14 software program. The experiments were carried out using a reversed-phase Zorbax ODS (Agilent Technologies, USA) C18 column (150 mm x 4.6 mm I.D., with a particle size of 5  $\mu$ m), maintained at  $40 \pm 1$  °C. The mobile phase consisted of a 1 % phosphoric acid:methanol mixture (45:55 v/v; pH 2.7) and was eluted isocratically at a flow rate of 1 mL min<sup>-1</sup>. The HPLC method was validated according to the ICH using of the following parameters: specificity, linearity, accuracy, precision, and determination of the limits of detection (LOD) and quantification (LOQ). For HPLC analysis, an aliquot of nanoemulsion was completely dissolved with mobile phase. The QU content (total concentration) in the colloidal suspensions was calculated after determining the drug concentration in the methanolic solutions and was expressed in mg of QU/mL of suspension. The QU recovery was calculated as being the percentage of the total drug concentration found in the suspensions in relation to the initially added amount.

## **2.7. Particle size analysis**

The mean particle diameter of the nanoemulsion and the polydispersity index were determined by photon correlation spectroscopy using a Zetasizer Nanoseries (Marvern

Instruments; Worcestershire, UK). Each size analysis lasted 300 s and was performed at 25°C with an angle detection of 90°.

### **2.8. *In vitro* release studies**

For the experiment, 2 mL of the nanoemulsion was placed into a dialysis bag (Spectra/Por® CE MWCO 10000, USA). The dialysis bags were placed into a dissolution apparatus containing 200 mL of ethanol:distilled water (35:75, v/v; pH 4.0) solution for sink conditions.. The release medium was maintained at 37 °C under mechanical stirring at 75 rpm. Samples of the release medium were withdrawn after 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, and 24h. The release medium was immediately replaced with fresh medium. The samples were analyzed by HPLC under the same conditions as described above. To evaluate the effect of the dialysis membrane on the drug release rate, a solution of QU in ethanol was placed into a dialysis bag and the QU diffusion through the membrane was assayed using the same conditions. All experiments were carried out in triplicates. The cumulative amounts of QU released (%) were plotted against time (h).

### **2.9. Animals**

A hundred and eighty *Wistar* rats, male, heterogenic, weighing around 250-300g were used in this study. The animals were kept in conventional cages, with normal temperature conditions ( $22 \pm 2$  ° C), relative humidity (60-80%) and light/dark cycle of 12h. Five animals were kept in cages with food and water *ad libitum*. This experimental protocol was in accordance with the Brazilian law and approved by the Animal Use Ethics Committee (CEUA) of the Federal University of the Rio Grande (FURG).

## **2.10. Intracerebral Hemorrhage induction**

ICH was carried out according to the model described by Rosenberg and collaborators, with some modifications<sup>19,20</sup>. For the procedure, the animals were anesthetized with a ketamine (90 mg/Kg; Dopalen) and xylazine (13 mg/kg; Anasedan) intraperitoneal injection and placed in the device for stereotaxic surgery. The ICH was induced by stereotaxic injection of collagenase type VII (Sigma) using Hamilton syringes in the coordinates regarding to animal left striatum (3 mm medium-lateral; 0 mm anteroposterior and 5 mm ventral from Bregma). We used 0.23 U of collagenase type VII in 2  $\mu$ L of saline solution<sup>21,22</sup>. The control animals received only 2  $\mu$ L of saline in the same coordinates.

## **2.11. Experimental groups**

The experimental groups were divided into 4 control groups (received saline in striatum coordinates), and 4 groups where ICH was performed. In both groups the animals underwent 4 different treatments: Carboxymethyl cellulose (CMC) 2%, quercetin suspension (QU-SP) (solubilised with CMC), blank nanoemulsion (BN) (nanoemulsion without Quercetin), and nanoemulsion with Quercetin (QU-N).

## **2.12. Behavioral evaluation of the animals**

**Analysis the motor behavior was performed through 3 tests:**

2.12.1. Open field test:

The open field test was used to evaluate general locomotor activity. The test was performed 24h after ICH. The apparatus consisted of a wooden box (60 x 40 x 50 cm) with 12 equal squares drawn on the floor. The total number of crossings (passage of the animal with the four limbs from one square to another) and number of rearings within five minutes was counted<sup>23</sup>.

#### 2.12.2. Beam walking test:

The BW apparatus consists of a wooden cylindrical bar with 70 cm of length and 4 cm of diameter suspended 1 m above a soft surface. The animals were trained 24h before ICH to enter the dark box parting from the enlightened spot, having to cross the entire length of the bar to complete the task. This test was used to evaluate the balance and the locomotor activity of the animals 48 and 72h after lesion. The time taken by the animal to cross the bar was measured (with a maximum time of 2 minutes) and the number of times the animal slipped with a limb contralateral to the lesion was counted, resulting in a score. The following score values were used: 0 (the animal moved along the shaft in less than two minutes without losing balance with a straight posture), 1 (the animal twitched the body to one side), 2 (stumbled 1 or 2 times sideways), 3 (stumbled more than three times), 4 (did not move for all the length of the shaft in less than two minutes remaining on it during this time), 5 (fell, trying to hold) and 6 (fell, without trying to hold)<sup>24,25</sup>.

#### 2.12.3. Foot fault test:

Twenty four and 72h after ICH, the animals were submitted to the foot fault test, which was performed to evaluate the motor precision of the animals. This test consists of placing the rat above a metallic grid with openings measuring 3 square cm. The number of times that the animal fails to place a paw on the grid, letting it go through its

openings, was counted. The percentages of motricity errors considering each side of the body were compared<sup>26,27</sup>.

### **2.13. Measurement of the hematoma size**

At the end of recovering time of ICH (3 days) the animals were anesthetized by intraperitoneal route with a lethal dose (100 mg/kg) of thiopental sodium<sup>28</sup>. After that, the brains were removed, sectioned and photographed for quantification of the size of the hematoma through ImageJ software.

### **2.14. Biochemical analysis**

#### **2.14.1. Preparation of homogenized brain tissue:**

After euthanasia, the brains were removed and the ipsilateral striatum was homogenized (1:4, p:v) in buffer containing Tris-HCl (100 mM), EDTA (2 mM) and MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O (5 mM) and cocktail of protease inhibitor (Sigma-Aldrich, LTDA), pH 7,75 . Later on, the samples were centrifuged at 10.000 g per 20 min at 4° C. The supernatants were used for the dosage of enzymatic activities, concentration of GSH, and peroxidated lipids. The dosages of enzymatic activities were relativised by the total amount of proteins present in the extracts. The measure of total proteins (550 nm) was carried out with a commercial kit based on the Biureto method, using a microplate reader (BiotelELx 800).

#### **2.14.2. Levels of reduced gluthione (GSH):**

The protocol used to measure GSH is described in the study of White<sup>29</sup>. This technique is based on the capacity of the compound 2,3-naftalenodicarboxialdeído (NDA) in reacting with the glutathione making a cyclic compound (NDA-GSH). The samples were incubated with cocktail of reaction. After the precipitation of proteins, the plate was centrifuged for 5 minutes at 2.500 rpm. Aliquots of 25 µL of supernatant of each well were transferred specific microplates for fluorescence detection. Next, 180 µL of solution of derivatization of NDA was added to all wells. After 30 min. of incubation, the intensity of fluorescence of the complex NDA-GSH was measured (472 ex/528) in a spectrofluorimeter (Víctor 2, Perkin Elmer).

#### 2.14.3. Determination of the total antioxidant capacity against peroxy radicals:

The protocol used to measure the total antioxidant capacity was followed according to the described by Amado<sup>30</sup>. It was measured by the decomposition of ABAP at 37°C. 2',7' diacetatodichlorofluorecein (H<sub>2</sub>DCF-DA) was added before the reading to be cleft by esterase present in the sample and the non-fluorescent H<sub>2</sub>DCF compound is oxidized by ROS to a fluorescent compound which was detected to a wavelength of 485 nm and 520 nm for excitation and emission respectively (Víctor 2, Perkin Elmer).

#### 2.14.4. Determination of glutathione-S-transferase activity (GST):

GST activity was based upon the GST-catalysed reaction between GSH and CDNB (1-chloro-2,4-dinitrobenzene). The GST-catalysed formation of GS-DNB produces a dinitrophenyl thioether which can be spectrophotometrically detected at 340 nm<sup>31</sup>.

#### 2.14.5. Determination of lipid oxidative damage:



The lipid peroxidation was determined by TBARS<sup>32</sup>. This method involves the reaction of malondialdehyde (MDA), a degradation product of lipid peroxidation, with thiobarbituric acid (TBA) under conditions of high temperature and acidity, producing a chromogen which was quantified by fluorometry (excitation: 520 nm, emission: 580 nm). Briefly, after homogenized, tissues were incubated at 95 °C during 30 min with 35 µM of butylated hydroxytoluene (BHT), 8.1% sodium dodecyl sulfate (SDS), 20% acetic acid and 0.8% TBA. After cooling to room temperature, n-butanol was added, centrifuged at 3000 g for 10 min at 15 °C. Tetramethoxypropane (ACROS Organics) was used as standard. Fluorescence was read at room temperature using a plate reader fluorimeter (Victor 2, Perkin Elmer).

### **2.15. Statistical Analysis**

The results were tested for normality and analyzed by ANOVA with post-test of Newman-Keuls. All the results are specified as Mean ± SEM. In all cases a significance level of at least 5% was used ( $p < 0.05$ )<sup>33</sup>. The results of antioxidants responses were analyzed by two-way ANOVA.

.

## **3. Results**

### **3.1. Nanoemulsion characterization**

A nanoemulsion displaying mean particle size of approximately 20nm and polydispersed index of 0.15 was obtained by the hot solvent diffusion technique, as described in material and methods section. The drug content and drug recovery were approximately 1,5 mg/ml and 98%, respectively as shown in Table 1. We have prepared the quercetin suspension (QU-SP) with the same quercetin final concentration of QU-N

(1,5mg/ml). QU release profile was characterized by biphasic kinetics, consisting of a faster release in the first 8h, followed by a sustained release of the drug over 24h.

Figure 1 shows the in vitro release kinetics of QU from QU-NE in ethanol:distilled water (35:75, v/v; pH 4.0) at 37 °C. Release experiments were carried out at pH 4.0 due to the low stability of QU in neutral and basic pH values. The experiments were carried out in sink conditions, since the maximum concentration of QU that could be reached in the release medium corresponded to 10% of its saturation concentration (1880 µg/mL). QU release profiles were characterized by biphasic kinetics, consisting of a faster release in the first 8 hours, followed by a sustained release of the drug over 24 hours in both cases.

### **3.2. Influence of administration of QU on behavioral tests:**

#### **3.2.1 Open Field**

In this test the number of crossings (locomotor activity) and the number of rearings (exploratory position) carried out by animals 24h after induction of ICH were quantified (Figure 2A and 2B respectively). The results have shown a significant difference in the number of crossings and rearings in controls when compared with animals which suffered ICH, confirming the damage in the locomotor and exploratory activities caused by brain hemorrhage. We could also observe that within the group which suffered ICH, the animals that received free and nanoencapsulated QU as treatment increased the number of crossings and rearings when compared with their respective control groups, suggesting a QU-induced improvement in this task.

### **3.2.2. Beam walking**

In the beam walking tests (locomotor activity, balance and motor skills), carried out 48 and 72h after induction of ICH (Figure 3A and 3B respectively), we observed a significant higher score, indicating higher neurologic damage in those animals which suffered ICH when compared with the controls. However, among the animals which suffered hemorrhage, there is a significant improvement in the score of those which were treated with a QU/N.

### **3.2.3. Foot Fault**

In the motor skill test on grids (fine motor skill), carried out 24 and 72h after ICH (Figure 4A and 4B), the percentage of motor errors occurred in all groups, always significantly higher on the right side, contralateral to the lesion. QU was not able to revert this behavior in none of the forms administered neither in 24h nor in 72h after the ICH.

### **3.3. Assessment of body weight**

To investigate possible alternations induced by ICH or administered treatments on animal's body weight, we carried out a weighing of these rats one day before stereotaxic surgery and on the day of euthanasia (Figure 5). We observed that animals which suffered ICH and were not treated with QU lost weight in a significantly way when compared to control animals.

### **3.4. Assessment of hematoma size**

The area of the hematoma was measured in all ICH groups (Figure 6) and it was possible to observe that the nanoemulsion of QU was able to reduce significantly the size of the hematoma.

### **3.5. Enzymatic activity and oxidative damage**

#### **3.5.1. Levels of reduced glutathione (GSH)**

Table 2 presents the concentration of GSH in the homogenized ipsilateral striatum, represented by nmol of GSH by mg of protein. The results point for the maintenance of GSH levels when comparing ICH groups with the control. The exception was in the case of nanoemulsion of QU, which was capable of increasing significantly ( $p < 0,01$ ) the levels of GSH in the striatum when compared with the animals which did not suffer and with the animals which ICH.

#### **3.5.2. Activity of glutathione-S-transferase (GST)**

The activity of GST, as shown in Table 2, suffered a significant depletion in the brain, caused by ICH ( $p < 0,05$ ). We can observe that the QU was not capable of preserving the levels of GST in the striatum of rats in the same level of control.

#### **3.5.3. Determination of the antioxidant capacity against peroxy radicals (ACAP)**

Table 2 shows a significant increase ( $p < 0,05$ ) of the antioxidant capacity of the tissue analyzed in all the experimental groups which suffered ICH, when compared with the control groups. In this dosage, the QU/N increased significantly the antioxidant capacity against peroxy radicals in the ICH group, compared with the other groups.

#### **3.5.4. Determination of lipid oxidative damage (TBARS)**

This analysis was done by measuring the content of malondialdehyde in nmol of tissue (in grams). The results expressed in table 2 show that the groups who suffered ICH had a significantly higher content of TBARS when compared to controls, except the group that underwent ICH and received N-QU, which kept the contents of TBARS in the control level ( $p < 0.05$ ). We emphasize that the same was not observed in the group receiving QU-SP.

#### **4. DISCUSSION**

Only a few neurologic conditions are as complex and devastating as strokes, which are the second worldwide leading causes of death<sup>34</sup>. Due to the growing increase of elderly population, and consequently growth of life expectancy, the search for therapies has become crucial in order to expand the strict repertoire of therapeutic opportunities for these devastating conditions<sup>35</sup>. It is known that the oxidative stress caused by this type of lesion has an important role in the pathogenesis of the illness, being responsible for increasing the neurologic deficits<sup>36,37</sup>. For this reason, we choice to use quercetin, a drug with great antioxidant potential, with the expectation of obtaining positive results in recovering functional damage caused by ICH.

However, due to the low absorption of QU because of its low solubility in water, this compound is not used in clinical approach. So, the development of a safe, stable and efficient delivery method for QU could present an interesting approach to investigate its potential therapeutic property. In recent years, the development of nanoemulsions aimed to improve the delivery of drugs and has attracted much interest.

Here we have compared the protective influence of QU-loaded nanoemulsion (QU-N) and free quercetin, in suspension (QU-SP) in an experimental model of ICH. We have demonstrated that the treatment with QU has a protective influence against some aspects

of ICH. It has been used in this context an experimental model which represents the physiological conditions of ICH and it has been evaluated if a single intraperitoneal injection of QU (30 mg/kg) could be beneficial for the animals. Motor activity, size of lesion and antioxidant parameters of brain tissue were investigated. The reproduction of ICH in the rat by injection of collagenase is a wide used method, described by Rosenberg<sup>19</sup>. This enzyme digests the collagenase present in the basal lamina of blood vessels and causes hemorrhage in the surrounding brain tissue<sup>38</sup>. Experimental ICH animal models are capable of reproducing the important global pathophysiologic events recorded in ICH in humans, including the development of edema and the pathological responses<sup>39</sup>. In this way, ICH models become important tools for a new understanding of the mechanisms implied in brain lesions after intracerebral hemorrhage.

The behavioral tests were carried out 24, 48 and 72h after ICH. Our focus was in the motor disorders, since the location where ICH occurs more frequently is the striatum<sup>3</sup>, responsible for learning, voluntary movement responses and from those which require motor skills, besides being related through efferent and afferent fibers with other parts of the brain, being also capable of causing even more serious motor damages<sup>40</sup>.

Our results show a reversion of motor deficit and consequently at an improvement in the exploratory activity (measured by rearings) of the rats evaluated on the open field task, when these animals were treated with free QU and QU loaded nanoemulsion, intraperitoneally, 2h after the lesion. The open field test measures the level of general activity, the capacity of movement and the exploratory capacity of the animal<sup>41</sup>. It can be noticed that during 24h after induction of ICH the rats that did not undertake the QU treatment have presented a significant motor damage in this test. Turner and Vink (2012) observed a reversion in the motor damage evaluated by open field in rats, after treatment in a model of occlusion of middle brain/cerebral artery, but they did not

observe changes in the exploratory activity in the same test<sup>42</sup>. In Wakade (2009) study that also used an antioxidant compound after induction of subarachnoid hemorrhage, the curcumin, the motor damage caused by lesion and evaluated by open field was not reverted<sup>43</sup>. On the other hand, Kilic *et. al.* (2008) used an antioxidant compound in an occlusion of middle cerebral artery model in mice and observed a significant improvement in motor skills in open field<sup>44</sup>. In our study, the QU/N did not prove to be different from free QU suggesting that for this parameter both are equally efficient in reversing the damage. In this case we can suppose that the compound reached the injured striatum probably by a disruption on the BBB induced by ICH.

The beam walking is a test which measures balance and the asymmetrical coordination<sup>45</sup> and it was carried out 48 and 72h after ICH. In order to make the rats accomplish the task correctly they were trained 24h before the surgery, four times and during a maximum of 2 minutes each attempt. In this test we can highlight the difficulty found by the animals which suffered ICH in crossing the beam of the device. Besides that, these ones had the tendency of losing balance to the contralateral side of the lesion (right side) and also it is noticed a higher difficulty in completing the test, as shown in the figure 3A and 3B. Nevertheless, the animals treated with QU-N had a reversion in the motor deficit and balance caused by ICH. It is important to highlight that QU-SP was not able of reverting the motor damage<sup>46</sup>. Porritt (2012) carried out the beam walking for testing mice after induction of ischemic stroke. Animal were treated with sulforaphane (an activator phytochemical of transition way of Nrf2 – k regulator of cell antioxidant defense) and he concluded that 24h after lesion, the treatment was no efficient against motor deficits and balance observed in the mice after stroke<sup>47</sup>. These negative results can be due to the difficulty of substances in overtaking the BBB and once they do, due to the low concentration that the drug reaches in the brain tissue. For

this purpose, the drug delivery system developed is a promise alternative. Even that in our case a large part of the barrier is unstructured, structured parts may still exist and in that case, the QU loaded nanoemulsion could facilitate permeation since it has a very small size (20nm). Also we believe that the formulation has sustained release of the drug over 24h<sup>48</sup>. The difference found in the BW between the QU-N and the QU-SP seems to be the reason of specificity of the test, since this one is more specific for balance and motor skills. We have observed that this difference did not appear in the open field and we judged that the reason is because open field is wider and measures the motor skills in a more roughly way.

Yet, in order to evaluate the motor skills and asymmetric coordination of the animals we used the foot fault test. This test is a relatively easy way to evaluate motor differences in the functioning of the limbs. The unilateral brain damage results in deficits of symmetry and, because of this, it is useful to use tests which have the capacity of detecting the asymmetries<sup>49</sup>. In the foot fault test carried out 24 and 72h after ICH we observed that the animals in all group submitted to ICH presented deficits in their motor coordination. The majority of motor skill errors were performed by the contralateral side of lesion. In a prior study, Meng and collaborators (2011) reported that the animals which underwent traumatic brain injury also presented motor skill deficits, performing more errors by contralateral side of lesion when compared with control groups. The authors carried out treatment with erythropoietin (EPO) IP and they described that the drug was not able of reverting the damage in a short time. The treatment only succeeded on the seventh day after lesion, and with several administrations, being dose-dependent<sup>49</sup>.

It is known that stroke is the main cause of incapacity in the long run in adults. The hand functioning is one of the most frequent consequences after stroke. Nevertheless, the early motor skill deficit of hand is an excellent predictor of recovering. Thus, some



authors suggest the quantification of foot fault through fails of anterior limbs<sup>50</sup>. In this study, we did not distinguish the quantification between anterior and posterior limbs, but by right and left hemibodies, according to Nishibe (2010)<sup>51</sup>. Furthermore, the functions evaluated in this test are more directly connected to motor skill areas of brain cortex, mainly through corticospinal tract (CST), responsible by, among many things, the fine motor skill<sup>52</sup>.

Zhao and collaborators (2007) used in an occlusion model of middle brain artery in rats a treatment with growing factors which regulate hematopoiesis, and they observed positive results (reduction of deficits of contralateral sides of lesion) only one month after the lesion<sup>53</sup>. Maldonado, 2008 also used the chronic exercise as treatment for an ischemic lesion. The results of foot fault only started to improve significantly after 10 days of treatment. These results make us think that fine motor skills, evaluated by foot fault, is a more refined action, which requires more time to be recovered. Since in our study we carried out an acute treatment and we visualize the results up to 72h after ICH, we did not find reversion in the deficit observed during this behavioral task<sup>54</sup>.

Besides the motor skill damages, and also because of them, the stroke, depending on the gravity, is extremely disabling and, as a result, the patients become incapable of performing the most simple daily tasks, such as eating. These factors and also dysphagia, a frequent symptom caused by stroke, lead to lose of weight<sup>55,56,57,58</sup>. For this reason and also due to motor skill deficit found by animals after ICH, we supposed it would be difficult for these animals to reach food. So, we carried out body weightening and observed that our results confirm the literature, which describes weight lost in patients who suffered strokes. Figure 5C shows us that the animals which were treated with QU in both formulations did not have significant weight lost. We can state that this

result is also de reflex of the improvement of the motor skills, as observed by the open field test.

The neurobehavioral results need to be correlated with morphologic changes and with the size of brain lesion<sup>59,60,61</sup>. Thus, we used photos of two brain slices and calculated an average of the hematoma size from the four faces of the slices. From that measure, we arrived to the conclusion that QU loaded nanoemulsion has reduced the size of the hematoma. Tang (2010) describes that the method of using the Image J Software along with Photoshop to quantify the brain hematoma is reliable and it has the advantage that the brain tissue can be used for extra dosages<sup>61</sup>. Our results suggest that the protective effect of QU loaded nanoemulsion observed in the behavioral tests could be due to its capacity for decreasing in the size of the hematoma. Savard (2009) carried out an intraperitoneal treatment of dexamethasone (corticosteroid), after induction of ICH in rats, using the same dose of collagenase used in this study and he observed a decreasing in the area of the hematoma during a period of 72h. Together with this result, the author describes significant improvement in the neurobehavioral tests, indicating that the hematoma size has influenced directly in the improvement of motor skill clinical condition. Moreover, Savard has concluded that the treatment seemed to be more efficient if administered in the first two hours after the insult, the same period of time that we used for administering QU intraperitoneally<sup>62</sup>. Ahmad and collaborators (2011) tested the QU in a model of occlusion of middle brain artery occlusion in rats, with a dose of 30 mg/kg and they observed a reduction in stroke area, relating that this reduction had a positive repercussion in the improvement of motor skill damage in the rats<sup>22</sup>. Our study is in agreement with these results. Besides that, our results are in agreement with some other studies carried out in rats, where motor deficits caused by ischemic stroke were attenuated with the use of antioxidant compounds<sup>63,64,65</sup>.

The intracerebral hemorrhage is the most severe vascular cerebral accident and the volume of the hematoma is one of the main determinants of the result. The expansion of the hematoma occurs mainly in the first 24h of the event and takes to secondary neurologic deterioration, the compression of neural tissue, to edema and inflammation. Treatments which aim at reducing the hematoma, therefore, can have bigger potential for affecting the result<sup>66</sup>. Nevertheless, the current recommendations of treatment based on recent clinical trial still reflect the doubts about the efficiency of medical approaches to reduce the expansion of the hematoma, since there is no safe drug that can be used for this matter<sup>67</sup>.

The role of reactive oxygen species (ROS) as mediators of oxidative brain damage after ICH is well accepted. The super production of ROS that cannot be balanced by endogenous antioxidant defenses of brain tissue results in lipid peroxidation, the BBB disruption, in increasing of brain edema, and neurologic deficits. The beneficial effects of antioxidant agents in the ICH model were recently demonstrated in some clinical trials<sup>68,69,70</sup>.

Therefore, the oxidative stress has contributed for DNA damage and brain lesion after ICH. A compound capable of reducing DNA oxidative lesions (for example, through iron chelation), could be a therapeutic agent for ICH<sup>71,72</sup>. For this purpose we have chosen QU, which is known for having strong antioxidant activity, capable of chelating some metal ions<sup>47</sup>.

The GSH is an endogenous and antioxidant peptide which avoids damages to cell components through ROS and free radicals decreasing. Besides functioning as a cleaner of direct free radicals, the GSH also works as substrate for GPx and for GST<sup>73</sup>. In a work performed by Haleagrahara and collaborators (2013) QU was used as treatment in

a lesion of in Parkinsons-induced neurotoxicity in rats. They observed that 50mg/kg of QU was capable to increase the levels of GSH and other antioxidants enzymes in the striatum of rats, showing a significant neuronal protection. They concluded that the treatment with QU has protected the neurons and it has increased the antioxidants enzymes in the striatum<sup>74</sup>. In our study, there was no significant difference in GSH levels between the groups which suffered ICH and the controls. This could express an intrinsic brain reaction against the damage caused by the lesion<sup>75</sup>. The GSH levels increased significantly with the treatment of QU-N, which could be related to motor skill improvement of these animals in the behavioral tests. This data suggest that QU nanoemulsion offers a protection of the brain against the oxidative stress. The difference between the two forms, free and nanoemulsion, can be explained by increased permeability of the BBB to nanoemulsion, and the sustained release of QU-N. The nanocarriers have the capacity of protecting the drugs from degradation, allowing the drug sustained release, reducing undesirable secondary effects and improve solubility and bioavailability of hydrophobic substances.

GSH-dependent enzymes offered a second line of defense, because they detoxify noxious subproducts generated by ROS and also help to avoid the dissemination of free radicals. Glutathione S-transferase (GST) is an isoenzyme involved in the cell detoxification of xenobiotic and endobiotic compounds. It catalyzes the bound of GSH and substrate for detoxification effects and it is involved in the mechanism of primary cell defense against the ROS<sup>76</sup>. Our results have demonstrated that there was a reduction of GST caused by ICH.

In an ischemic stroke by occlusion model of bilateral carotid, Prakash and collaborators (2011) described that the levels of GST decreased significantly with the ischemia in the rats brains. The enzymatic levels were restored close to control with the treatment with

a natural origin compound, with antioxidant properties, as well as in our study<sup>77</sup>. In this study, the GST decrease in the striatum of ICH groups in those treated with QU could be due to reduction of GSH levels or due to increase in the concentration of electrophilic compounds<sup>78</sup>.

The brain is particularly vulnerable to oxidative stress, once it contains low levels of antioxidant enzymes and elevated iron concentration that catalyze the production of free radicals, and it is rich in unsaturated fatty acids that are targets for lipid peroxidation<sup>79,80</sup>. Thus, we decided to determine the antioxidant capacity against peroxyl in striatum of rats. The results of our study have shown a significant increase of the antioxidant capacity of tissue against peroxyl radicals analyzed of groups which suffered ICH, and an even bigger increase in the groups which suffered ICH and were treated with QU-N. This demonstrates that even with low levels of antioxidant enzymes, the brain has an intrinsic capacity against damages induced by reactive species and that QU potentiates this defense. In the same way, Ahamad and collaborators (2011) investigated the effects of a therapy with selenium and melatonin, synergically, in model of MCAO in rats and observed an increase in the antioxidant capacity and consequently reduction of motor skill damages<sup>22</sup>.

Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) are formed as a byproduct of lipid peroxidation. As we know reactive oxygen species (ROS) have extremely short half-lives, so they are difficult to measure directly. Instead, what can be measured are several products of the damage produced by oxidative stress, such as TBARS. Assay of TBARS measures malondialdehyde (MDA) present in the sample, as well as malondialdehyde generated from lipid hydroperoxides by the hydrolytic conditions of the reaction<sup>32</sup>. Our results demonstrate that treatment with QU-N levels of TBARS remained equal to its control and the bleeding generally increased thiobarbituric acid-reactive substances.

Already in 1979, Tomita and collaborators report that in patients after ICH there is a significant increase in thiobarbituric acid reactive substances<sup>80</sup>. Senes (2007) measured TBARS after acute stroke in humans and also describes a significant increase post lesion<sup>81</sup>. Moreover, Torri in 1997<sup>82</sup> an antioxidant tested for the treatment of subarachnoid hemorrhage (SAH) in rats induced and describes that HSA not increased TBARS levels. In their study, Ahamad observed that treatment with QU post model middle cerebral artery occlusion (MCAO) significantly reduced the levels of TBARS, compared with the MCAO group<sup>22</sup>.

We can conclude from our results that free as well as QU loaded nanoemulsion were capable of altering behavioral parameters of ICH. Also, QU-N reduced the size of hematoma and attenuated weight loss caused by ICH. In terms of antioxidant parameters, we observed that the QU-N influences in the oxidative stress through the increase of some antioxidant enzymes, presenting them therapeutically potential against ICH. The results shown here suggests that the QU-loaded nanoemulsions developed in this study are promising in ICH treatment. We suggest more studies with chronicle treatment in order to evaluate other parameters in the pathogenesis of intracerebral hemorrhage.

## **ACKNOWLEDGMENTS**

This work was supported by PROCAD/CNPq 552457/2011-6. Aline Ribeiro Galho was a fellow from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). The authors thank to Andressa Bernardi for critical reviewing of the manuscript.

## 5. REFERENCES

1. Kirkman AM, Allan SM, Parry-Jones AR. Experimental intracerebral hemorrhage: avoiding pitfalls in translational research. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*. 2011; (31): 2135–2151.
2. Ma Q, Khatibi N, Chen H, *et. al.* History of Preclinical Models of Intracerebral Hemorrhage. *Acta Neurochir Suppl*. 2011; (111): 3–8.
3. Xi G, Keep RF, Hoff JT. Mechanisms of brain injury after intracerebral haemorrhage. *Lancet Neurol*. 2006; (5):53-63.
4. Katsuki H. Therapeutic effect of nicotine in a mouse model of intracerebral hemorrhage. *J Pharmacol Sci*. 2010; (114):366-378.
5. Johnston SC, Mendis S, Mathers CD. Global variation in stroke burden and mortality: estimates from monitoring, surveillance, and modeling. *Lancet Neurol*. 2009; 8(4):345-54.
6. Krishnamurthi RV, Feigin VL, Forouzanfar MH, *et. al.* Behalf of the Global Burden of Diseases, Injuries, and Risk Factors Study 2010 (GBD 2010) and the GBD Stroke Experts Group. Global and regional burden of first-ever ischaemic and haemorrhagic stroke during 1990–2010: findings from the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet Glob Health* 2013; published online Oct 24. [http://dx.doi.org/10.1016/S2214-109X\(13\)70089-5](http://dx.doi.org/10.1016/S2214-109X(13)70089-5).
7. Sacco RL, Kasner SE, Broderick JP, *et. al.* An Updated Definition of Stroke for the 21st Century: A Statement for Healthcare Professionals From the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke*. 2013; (44):2064-2089.
8. MacLellan CL, Langdon KD, Churchill KP, *et. al.* Assessing cognitive function after intracerebral hemorrhage in rats. *Behavioural Brain Research*. 2009; (198): 321–328.



9. Selvakumar K, Bavithra S, Krishnamoorthy G, *et. al.* Polychlorinated Biphenyls-Induced Oxidative Stress on Rat Hippocampus: A Neuroprotective Role of Quercetin. *The ScientificWorld Journal*. 2012; 2012:980314.
10. González-Gallego J, Sánchez-Campos S, Tuñón MJ. Anti-inflammatory properties of dietary flavonoids. *Nutr. Hosp.* 2007; (22): 287–293.
11. Rogerio AP, Dora CL, Andrade EL. Anti-inflammatory effect of quercetin-loaded microemulsion in the airways allergic inflammatory model in mice. *Pharmacological Research*. 2010; (61):288–297.
12. Yousef MI, Omar SAM, El-Guendi MI. Potential protective effects of quercetin and curcumin on paracetamol-induced histological changes, oxidative stress, impaired liver and kidney functions and haematotoxicity in rat. *Food and Chemical Toxicology*. 2010; (48):3246–3261.
13. Kumari A, Kumar YS, Pakade YB, *et. al.* Development of biodegradable nanoparticles for delivery of quercetin. 2010; (80):184-192.
14. Fang R, Jing1 H, Chai Z, *et. al.* Design and characterization of protein-quercetin bioactive nanoparticles. *Journal of Nanobiotechnology*. 2011; 9(19).
15. Dora CL, Silva LFC, Tagliari MP, *et. al.* Formulation Study of Quercetin-Loaded Lipid-Based Nanocarriers Obtained by Hot Solvent Diffusion Method. *Latin American Journal of Pharmacy*. 2011; (2)30.
16. Dora CL, Silva LF, Putaux JL, Nishiyama Y, Pignot-Paintrand I, Borsali R, *et al.* Poly(ethylene glycol) hydroxystearate-based nanosized emulsions: effect of surfactant concentration on their formation and ability to solubilize quercetin. *Journal of biomedical nanotechnology*. 2012;8(2):202-10.
17. Durrieu V, Gandini A, Belgacem MN, Blayo A, Eiselé G, Putaux J-L. Preparation of aqueous anionic poly-(urethane-urea) dispersions: Influence of

- the nature and proportion of the urethane groups on the dispersion and polymer properties. *Journal of Applied Polymer Science*. 2004;94(2):700-10.
18. International conference on Harmonization (ICH) Of Technical Requirements for Registration of pharmaceuticals for Human Use, ICH Harmonized Tripartite Guideline, Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology, ICH-Q2 (R1), November (2005), Geneva, Switzerland.
  19. Rosenberg GA, Mun-Bryce S, Wesley M, *et. al.* Collagenase-induced intracerebral hemorrhage in rats. *Stroke*. 1990; (21):801-807.
  20. Kim M, Hamilton SE, Guddat LW, *et. al.* Plant collagenase: Unique collagenolytic activity of cysteine proteases from ginger. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2007; 1770(12):1627-1635.
  21. Lekic T, Hartman R, Rojas H, *et. al.* Characterization of the brain injury, neurobehavioral profiles, and histopathology in a rat model of cerebellar hemorrhage. *J Neurotrauma*. 2010; (27):627-637.
  22. Ahmad A, Mohd K, Nasrul H, *et. al.* Quercetin protects against oxidative stress associated damages in a rat model of transient focal cerebral ischemia and reperfusion. *Neurochem Res*. 2011; (36):1360–1371.
  23. Vianna MRM, Izquierdo LA, Barros DM, *et. al.* Pharmacological differences between memory consolidation of habituation to an open field and inhibitory avoidance learning. *Bras J Med Biol Res*. 2001; (34):233-240.
  24. Rogers DC, Campbell CA, Stretton JL, *et. al.* Correlation between motor impairment and infarct volume after permanent and transient middle cerebral artery occlusion in the rat. *Stroke*. 1997; (28):2060-2066.

25. Zhang I, Schallert T, Zhang ZG, *et. al.* A test for detecting long-term sensorimotor dysfunction in the mouse after focal cerebral ischemia. *J. Neurosci. Meth.* 2002; (117): 207-214.
26. Beray-Berthat V, Delifer C, Besson VC, *et. al.* Long term histological and behavioural characterisation of a collagenase induced model of intracerebral haemorrhage in rats. *J. Neurosci. Methods.* 2010; (191): 180-190.
27. Jover R, Rodrigo R, Felipe V, *et. al.* Brain Edema and Inflammatory Activation in Bile Duct Ligated Rats with Diet-Induced Hyperammonemia: A Model of Hepatic Encephalopathy in Cirrhosis. *Hepatology.* 2006; (43): 1257-66.
28. Artwohl J, Brown P, Corning B, Stein S. Report of the ACLAM Task Force on Rodent Euthanasia. *J Am Assoc Lab Anim Sci.* 2006; 45(1):98-105.
29. White JA, Maneli AM, Holmberg KH, *et. al.* (2003). Fluorescence based microtiter plate assay for glutamate-cysteine ligase activity. *Neurobiol. Dis;* 18:459-465.
30. Amado LL, Garcia ML, Monserrat JM, *et. al.* A method to measure total antioxidant capacity against peroxy radicals in aquatic organisms: application to evaluate microcystins toxicity. *Sci. Tot. Env.* 2009; (407): 2115-2123.
31. Saicic ZS, Pajovic SB, Korac B, Spasic MB, Martinovic JB, Petrovic VM. Glutathione-dependent antioxidant enzyme activities and glutathione content in the rat brain at different stages of oestrous cycle. *Physiol Res.* 1998; (47):61-68.
32. Oakes KD, Kraak GJVD. Utility of the TBARS assay in detection oxidative stress in white sucker (*Catostomus commersoni*) populations exposed to pulp mill effluent. *Aquat. Toxicol.* 2003; (63):447-463.
33. Zar JH. *Biostatistical analysis.* 1999; Prentice Hall, New Jersey, 4. ed.

34. Kim AS, Johnston SC. Global variation in the relative burden of stroke and ischaemic heart disease. *Circulation* 2011; (124):314-323.
35. Leyden JM, Kleinig TJ, Newbury J, *et. al.* Adelaide stroke incidence study: declining stroke rates but many preventable cardioembolic strokes. *Stroke*. 2013; 44(5):1226-31.
36. Parizadeh MR, Azarpazhooh MR, Mobarra N, *et.al.* Prooxidant-antioxidant balance in stroke patients and 6-month prognosis. *Clin Lab*. 2011; (57):183-191.
37. Boisseau P, Loubaton B. Nanomedicine, nanotechnology in medicine. *C. R. Physique*. 2011; (12):620–636.
38. Del Bigio MR, Yan HJ, Buist R, Peeling J. Experimental intracerebral hemorrhage in rats: magnetic resonance imaging and histopathological correlates. *Stroke*. 1996; (27): 2312–2319.
39. Andaluz N, Zuccarello M, Wagner KR. Experimental animal models of intracerebral hemorrhage. *Neurosurg Clin N Am*. 2002; 13(3):385-93.
40. Goldstein BL, Barnett BR, Roesch MR. Ventral striatum encodes past and predicted value independent of motor contingencies. *J Neurosci*. 2012; 32(6): 2027–2036.
41. Hartmana R, Lekic T, Rojas H. Assessing functional outcomes following intracerebral hemorrhage in rats. *Brain research*. 2009; (1280):148 – 157.
42. Turner RJ, Vink R. Combined tissue plasminogen activator and an nk1 tachykinin receptor antagonist: an effective treatment for reperfusion injury following acute ischemic stroke in rats. *Neuroscience*. 2012; (220):1–10.
43. Wakade C, King MD, Laird MD, *et. al.* Curcumin Attenuates Vascular Inflammation and Cerebral Vasospasm After Subarachnoid Hemorrhage in Mice. *Antioxidants & Redox Signaling*. 2009; 11(1): 35-46.

44. Kilic E, Kilic U, Bacigaluppi M, *et. al.* Delayed melatonin administration promotes neuronal survival, neurogenesis and motor recovery, and attenuates hyperactivity and anxiety after mild focal cerebral ischemia in mice. *Journal of Pineal Research*. 2008; (45):142-148.
45. Hernandez TD, Schallert T. Seizures and recovery from experimental brain damage. *Exp Neurol*. 1988; (102):318–324.
46. Shelton SB, Pettigrew DB, Hermann AD. A simple, efficient tool for assessment of mice after unilateral cortex injury. *J Neurosci Methods*. 2008; 168(2): 431–442.
47. Porritt MJ, Andersson HC, Nilsson M, *et. al.* Photothrombosis-Induced Infarction of the Mouse Cerebral Cortex Is Not Affected by the Nrf2-Activator Sulforaphane. *PLoS One*. 2012; 7(7):41090.
48. Schaar KL, Brenneman MM, Savitz SI. Functional assessments in the rodent stroke model. *Exp Transl Stroke Med*. 2010; 2(13).
49. Meng Y, Xiong Y, Mahmood Y, *et. al.* Dose-dependent neurorestorative effects of delayed treatment of traumatic brain injury with recombinant human erythropoietin in rats. *J Neurosurg*. 2011; 115(3): 550–560.
50. Liu Z, Li Y, Zhang RL. Bone marrow stromal cells promote skilled motor recovery and enhance contralesional axonal connections after ischemic stroke in adult mice. *Stroke*. 2011; 42(3): 740–744.
51. Nishibe M, Barbay S, Guggenmos D, *et. al.* Reorganization of Motor Cortex after Controlled Cortical Impact in Rats and Implications for Functional Recovery. *J. Neurotrauma*. 2010; (27):2221-2232.

52. Liu Z, Li Y, Zhang X, *et. al.* Contralesional axonal remodeling of the corticospinal system in adult rats following stroke and bone marrow stromal cell treatment. *Stroke*. 2008; (39):2571–2577.
53. Zhao L, Berra HH, Duan W, *et. al.* Beneficial Effects of Hematopoietic Growth Factor Therapy in Chronic Ischemic Stroke in Rats. *Stroke*. 2007; (38):2804-2811.
54. Maldonado MA, Allred RP, Felthouser EL, *et. al.* Motor skill training, but not voluntary exercise, improves skilled reaching after unilateral ischemic lesions of the sensorimotor cortex in rats. *Neurorehabil Neural Repair*. 2008; (22):250-261.
55. Jönsson A, Lindgren I, Norrving B. Weight Loss After Stroke: A Population-Based Study From the Lund Stroke Register. *Stroke*. 2008; (39):918-923.
56. Perry L, McLaren S. An exploration of nutrition and eating disabilities in relation to quality of life at 6 months post-stroke. *Health Soc Care Community*. 2004; (12):288–297.
57. Papacocea T, papacocea R, Bădărău A, *et. al.* Oxidative stress and antioxidant therapy in intracerebral hemorrhage. *Therapeutics, pharmacology and clinical toxicology*. 2011; 270-273.
58. Viu B, Solev IN, Elizarova OS, *et. al.* [Neuroprotector effect of human recombinant erythropoietin sorbed on polymer nanoparticles studied on model of intracerebral post-traumatic hematoma (hemorrhagic stroke)]. *Eksp Klin Farmakol*. 2011; 74(10):17-22.
59. Hua Y, Nakamura T, Keep RF, *et. al.* Long-term effects of experimental intracerebral hemorrhage: the role of iron. *J Neurosurg*. 2006; (104):305–312.

60. Felberg RA, Grotta JC, Shirzadi AL, *et. al.* Cell death in experimental intracerebral hemorrhage: the "black hole" model of hemorrhagic damage. *Ann Neurol.* 2002; 51:517–524.
61. Tang XN, Berman AE, Swanson RA. Digitally quantifying cerebral hemorrhage using Photoshop® and Image j. *J Neurosci Methods.* 2010; 190(2): 240–243.
62. Savard C, Lema PP, Hélie P. Effects of Timing of Dexamethasone Treatment on the Outcome of Collagenase-Induced Intracerebral Hematoma in Rats. *Comp Med.* 2009; 59(5): 444–448.
63. Khan MM, Ahmad A, Ishrat T, *et. al.* Rutin protects the neural damage induced by transient focal ischemia in rats. *Brain Res.* 2009; (1292):123–135.
64. Saleem S, Ahmad M, Ahmad AS, Yousuf S, *et. al.* Effect of Saffron (*Crocus sativus*) on neurobehavioral and neurochemical changes in cerebral ischemia in rats. *J Med Food.* 2006; (2):246–253.
65. Yousuf S, Atif F, Ahmad M, Hoda N, *et. al.* Resveratrol exerts its neuroprotective effect by modulating mitochondrial dysfunctions and associated cell death during cerebral ischemia. *Brain Res.* 2009; (1250):242–253.
66. Zhan MDY, Chen MDC, Suzuki MDH, *et. al.* Hydrogen gas ameliorates oxidative stress in early brain injury after subarachnoid hemorrhage in rats. *Crit Care Med.* 2012; (40):4.
67. Anderson CS. Medical management of acute intracerebral hemorrhage. *Curr Opin Crit Care.* 2009; (15):93–98.
68. Rojas H, Lekic T, Chen W, *et. al.* The antioxidant effects of melatonin after intracerebral hemorrhage in rats. *Acta Neurochir Suppl.* 2008; (105):19–21.
69. Erssahin M, Toklu HZ, Erzik C, *et. al.* The Anti-Inflammatory and Neuroprotective Effects of Ghrelin in Subarachnoid Hemorrhage-Induced

- Oxidative Brain Damage in Rats. *Journal of neurotrauma*. 2010; (27):1143–1155.
70. Nakamura T, Keep RF, Hua Y, *et. al.* Oxidative DNA injury after experimental intracerebral hemorrhage. *Brain Res*. 2005; 1039(1-2):30-6.
71. Shang H, Yang D, Zhang W, *et. al.* Time course of Keap1-Nrf2 pathway expression after experimental intracerebral haemorrhage: correlation with brain oedema and neurological deficit. *Free Radic Res*. 2013; 47(5):368-75.
72. Sanchari D, Ardhendu K, Aparajita G, *et. al.* Nanoparticulated Quercetin in Combating Age Related Cerebral Oxidative Injury. *Curr Aging Sci*. 2008; (1):169-174.
73. Dwivedi N, Bhutia YD, Kumar V, *et. al.* Effects of combined exposure to dichlorvos and monocrotophos on blood and brain biochemical variables in rats. *Hum Exp Toxicol*. 2010; 29 :121–9.
74. Haleagrahara N, Siew CJ, Ponnusamy K. Effect of quercetin and desferrioxamine on 6-hydroxydopamine (6-OHDA) induced neurotoxicity in striatum of rats. *J Toxicol Sci*. 2013; 38(1):25-33.
75. Shimizu HMD, Kiyohara Y, Kato I. Population: The Hisayama Study Relationship Between Plasma Glutathione Levels and Cardiovascular Disease in a Defined. *Stroke*. 2004; 35:2072-2077.
76. Salinas AE, Wong MG. Glutathione S-transferases- A review. *Curr Med Chem*. 1999; 6(4):279-309.
77. Prakash T, Kotresha D, Nedendla RR. Neuroprotective activity of *Wedelia calendulacea* on cerebral ischemia/reperfusion induced oxidative stress in rats. *Indian J Pharmacol*. 2011; 43(6): 676–682.



78. Nørskov MS, Frikke-Schmidt R, Loft S, *et. al.* Copy Number Variation in Glutathione S-Transferases M1 and T1 and Ischemic Vascular Disease: Four Studies and Meta-Analyses. *Circ Cardiovasc Genet.* 2011; (4):418-428.
79. Wang GH, Jiang J, Li YC. Free-Radical Scavenger Edaravone Treatment Confers Neuroprotection Against Traumatic Brain Injury in Rats. *journal of neurotrauma.* 2011; 28:2123–2134.
80. Tomita C, Sano M, Serizawa KH, *et. al.* Fluctuation of Lipid Peroxides and Related Enzyme Activities at Time of Stroke in Stroke-Prone Spontaneously Hypertensive Rats. *Stroke.* 1979; 10(3).
81. Seneş M, Kazan N, Coşkun O, *et. al.* Oxidative and nitrosative stress in acute ischaemic stroke. *Ann Clin Biochem.* 2007; 44(1):43-7.
82. Torri C, Café C, Adinolfi D, *et. al.* Synaptosomal iron-dependent lipid peroxidation inhibition after subarachnoid hemorrhage by lazaroid in vivo treatment. *Molecular and Chemical Neuropathology.* 1997; 30(1-2):15-24.

## LEGENDS TO THE FIGURES

**Figure 1:** Cumulative percentage of QU released from nanoemulsions.

**Figure 2:** Open field test performed 24h after stereotaxic surgery. The number of crossings (A) and the number of rearings (B). (ANOVA, n = 11-14, \* p < 0.05; \*\* p ≤ 0.01; \*\*\* p < 0.01; # p < 0.05, ## p < 0.01).

**Figure 3:** Beam walking test performed 24 and 48h after stereotaxic surgery. The locomot capacity and the beam of the animals were scored as described in Methods section at 48 (A) and 72h (B) after the stereotaxic surgery. (ANOVA, n = 13-14, \*\*\* p < 0.01; ## p ≤ 0.01; ### p < 0.01; && p ≤ 0.01; ### p < 0.01).

**Figure 4:** Foot fault test performed 24 and 72h after stereotaxic surgery. The foot fault test in 24h (A), the percentage of motor errors with the contralateral (right limbs - RS) and ipsilateral (left limbs - LS). In all ICH groups the foot slips were mainly made by the lesion contralateral side (ANOVA, n=8-15, + means different from RS; + = p<0.05, ++ p<0.01, +++ = p<0.001). In 72h after ICH (B) this pattern was maintained in all the groups (ANOVA, n=9-14, ++ p<0.01, +++ = p<0.001). Both figures demonstrate that there was not statistical difference among experimental groups.

**Figure 5:** The body weight (C) of the animals 72h after surgery is shown in this figure (ANOVA, n= 14-18; \* p<0.05).

**Figure 6:** Hematoma size 72h after ICH. The illustration in (A) shows the area of collagenase-induced ICH, in the left striatum. The image in (B) is representative from coronal slices showing the hematoma size. As shown in (A) only the QU-N was able to reduce the size of the hematoma (ANOVA, & means different from QU-SP, & p < 0.05).

**Table 1:** Quercetin nanoemulsions characterization.

**Table 2:** Values are expressed as mean  $\pm$  S.E of n = 3-6 animals. Significance was determined by one-way ANOVA followed by Newman-Keuls post-hoc test for multiple comparisons. \*p<0.01 ICH versus control; # p<0.01 ICH+QU/N versus ICH+ QU/SP.

FIGURES

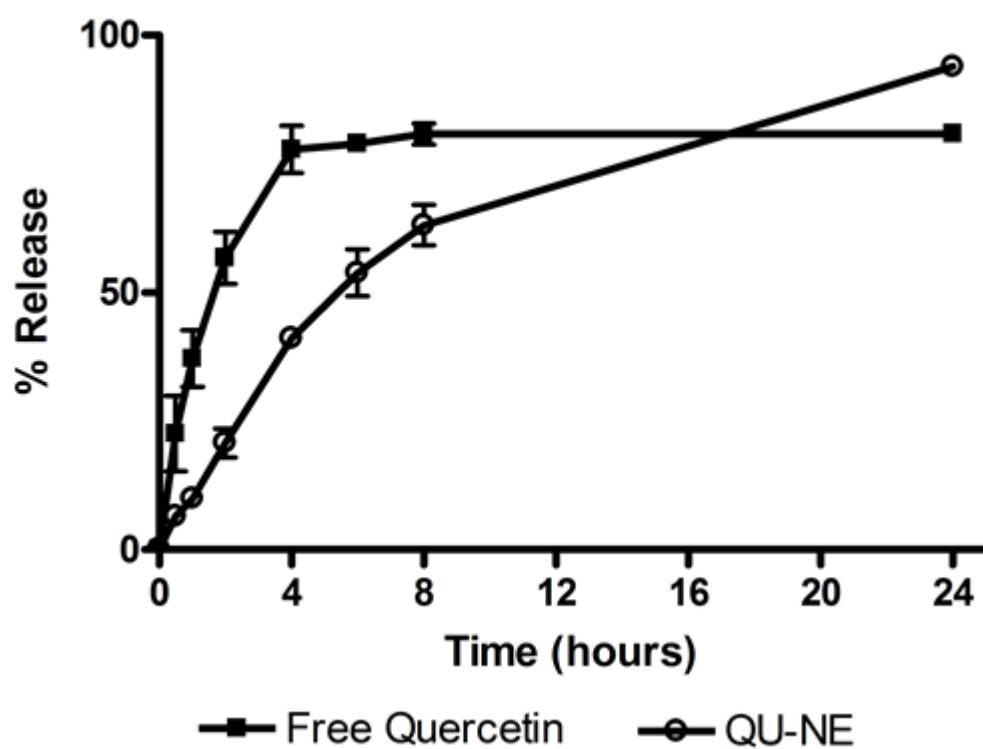


Figure 1

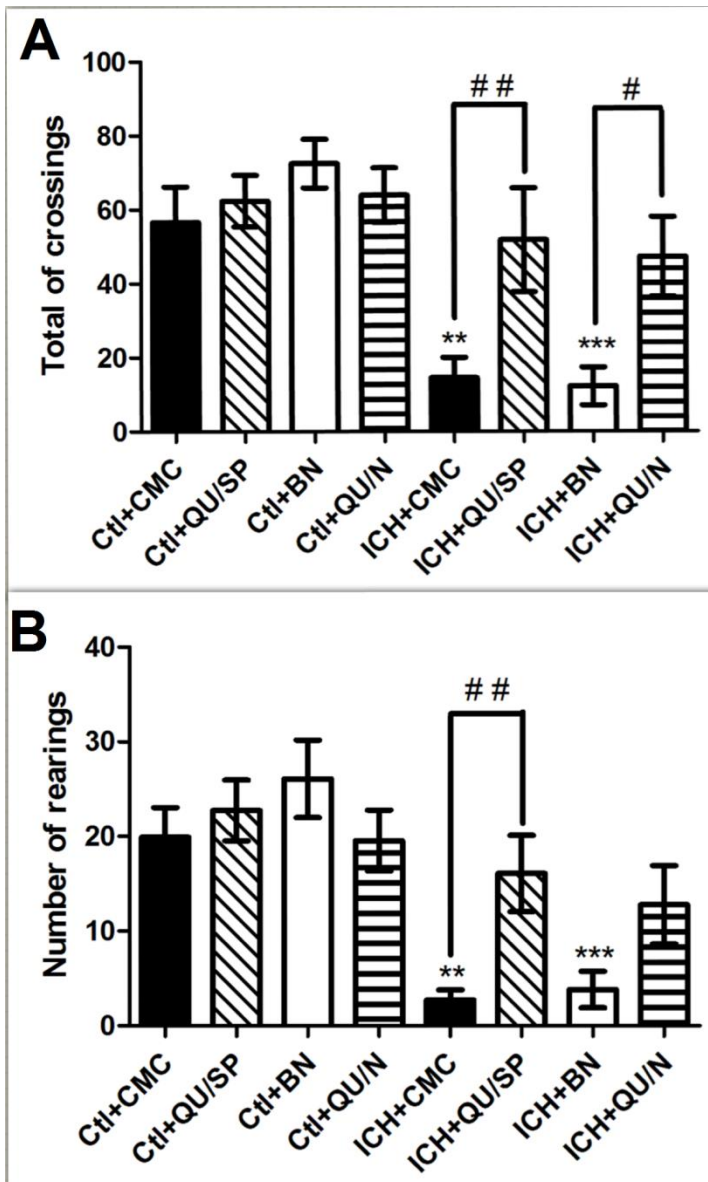


Figure 2

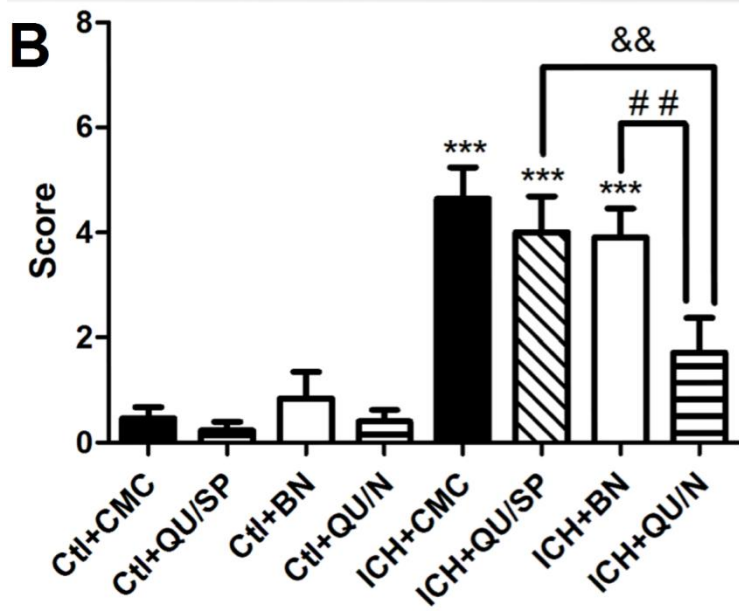
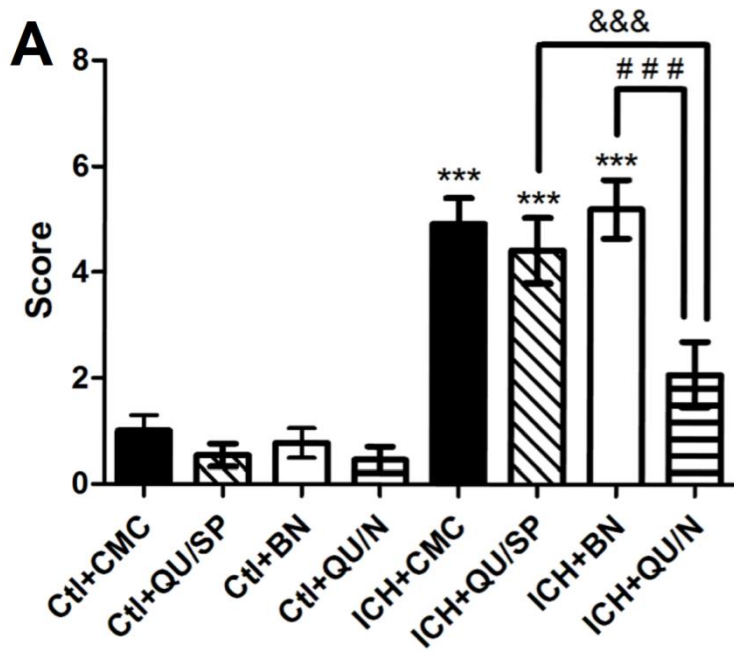


Figure 3

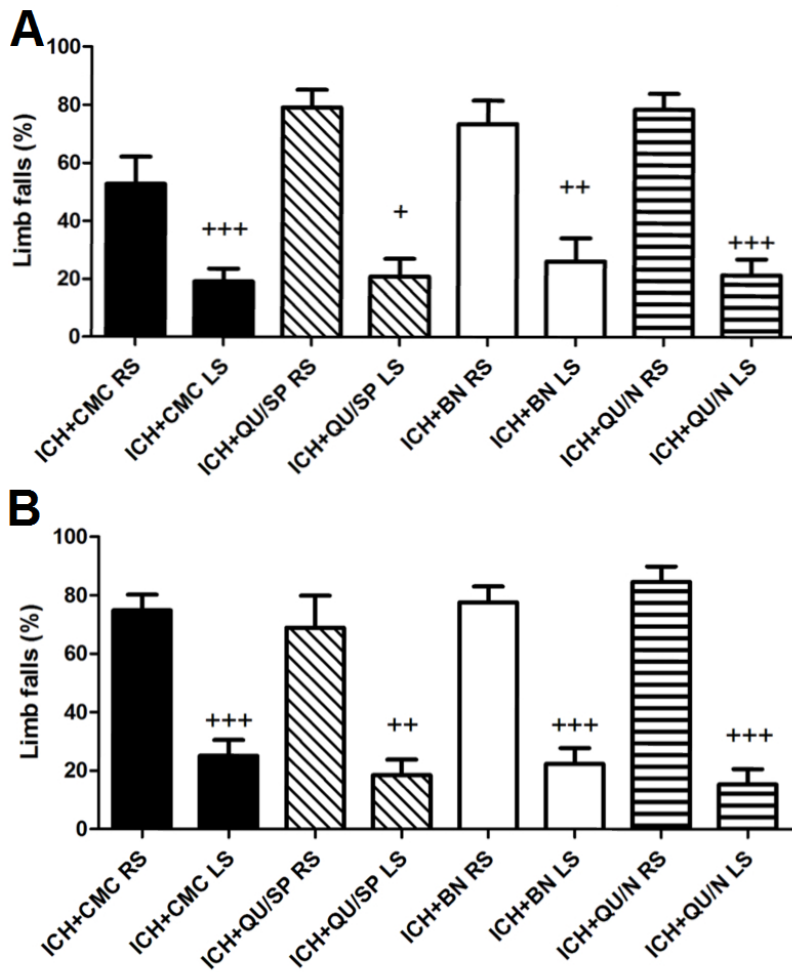


Figure 4

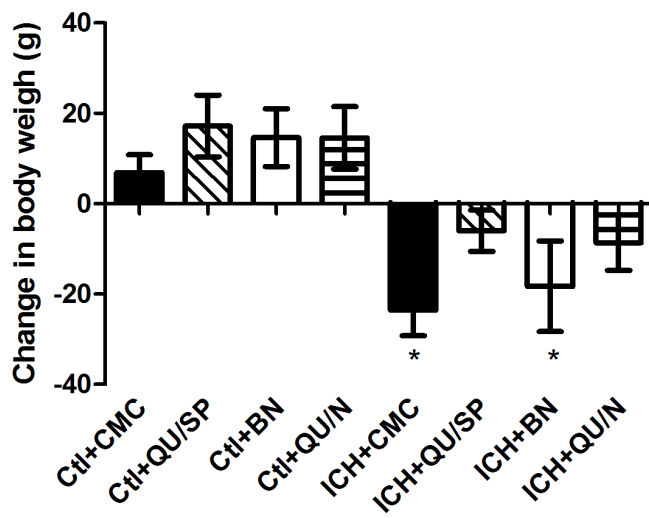
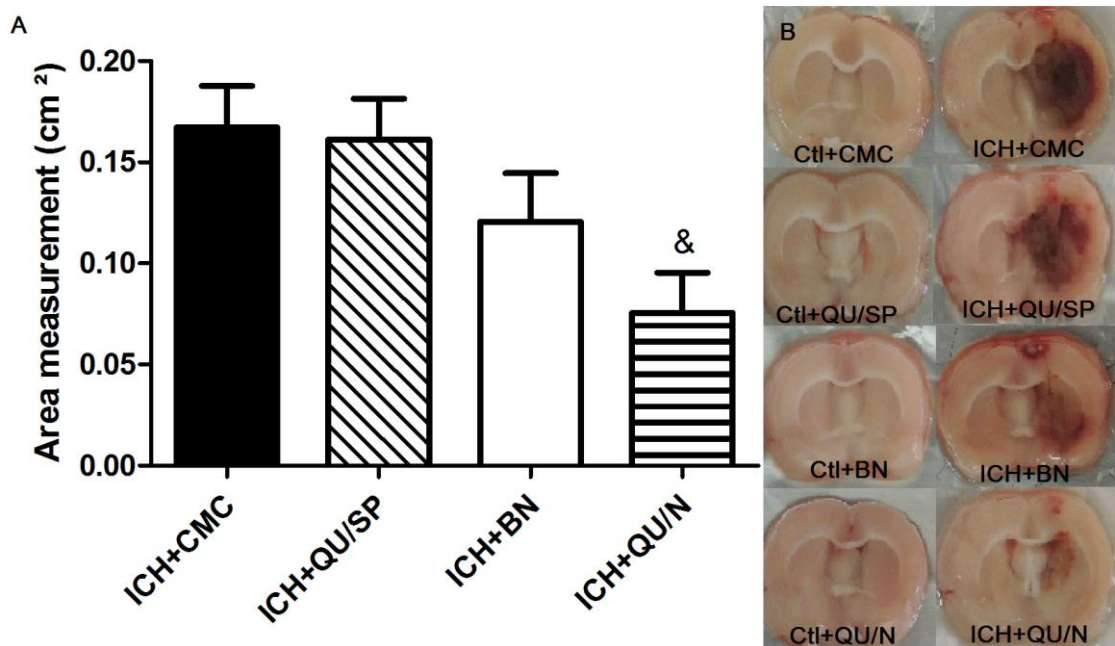


Figure 5



**Figure 6**

| NE   | Size (nm)       | PDI              | $\zeta$ -potential (mV) | QU content ( $\mu\text{g/mL}$ ) | Recovery (%)   |
|------|-----------------|------------------|-------------------------|---------------------------------|----------------|
| QU-N | 19,25 $\pm$ 0,2 | 0,20 $\pm$ 0,004 | -5,34 $\pm$ 0,5         | 1492 $\pm$ 21,1                 | 99,5 $\pm$ 0,1 |

**Table 1**

|              | Ctl+CMC            | Ctl+QU/SP          | Ctl+BN             | Ctl+QU/N           | ICH+CMC            | ICH+ QU/SP         | ICH+BN             | ICH+QU/N           |
|--------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| <b>GSH</b>   | 53 $\pm$ 13,770    | 45 $\pm$ 12,650    | 73 $\pm$ 13,840    | 70 $\pm$ 2,790     | 92 $\pm$ 27,550    | 69 $\pm$ 16,960    | 131 $\pm$ 36,9100  | 408 $\pm$ 92,320*# |
| <b>ACAP</b>  | 0.317 $\pm$ 0.113  | 0.704 $\pm$ 0.211  | 0.545 $\pm$ 0.112  | 0.366 $\pm$ 0.148  | 3.182 $\pm$ 1.352* | 2.451 $\pm$ 0.408* | 2.591 $\pm$ 0.598* | 7.11 $\pm$ 2.640*  |
| <b>GST</b>   | 21.543 $\pm$ 2,653 | 25.667 $\pm$ 2.873 | 20.753 $\pm$ 2.182 | 25.092 $\pm$ 5.983 | 3.517 $\pm$ 1.114* | 5.586 $\pm$ 2.291* | 7.126 $\pm$ 2.615* | 9.712 $\pm$ 1.997* |
| <b>TBARS</b> | 4.765 $\pm$ 2.673  | 5.173 $\pm$ 3,984  | 5.098 $\pm$ 2.873  | 6.183 $\pm$ 1.333  | 8.520 $\pm$ 1.031* | 7.993 $\pm$ 1.972* | 9.093 $\pm$ 1,863* | 5.298 $\pm$ 4,099  |

**Table 2**



## **CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Analisando os resultados obtidos, podemos concluir que a quercetina nanoencapsulada apresenta-se como um potencial agente terapêutico para a ICH, sendo capaz de reverter danos locomotores, de equilíbrio e melhorar alguns parâmetros bioquímicos alterados em razão da ICH. Contudo, mais estudos são necessários para avaliar as consequências de um tratamento crônico, bem como a ação do composto sobre outros parâmetros nos quais a ICH influencia.

## **PERSPECTIVAS**

- Avaliar o efeito da quercetina livre e nanoencapsulada pós HIC na ativação microglial através da imunohistoquímica para as proteínas CD11b e ED-1;
- Investigar possíveis oscilações nos níveis de citocinas pró-inflamatórias causadas pela HIC e se a quercetina livre e nanoencapsulada interfere nesses níveis;
- Medir a atividade enzimática pós HIC das enzimas SOD, Cat, GPx, Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup> ATPase, GR e se o tratamento com quercetina livre e nanoencapsulada tem efeito sobre essas enzimas;
- Avaliar a influencia do tratamento da quercetina livre e nanoencapsulada pós HIC sobre as espécies reativas de oxigênio;
- Realizar um tratamento crônico com quercetina livre e nanoencapsulada e averiguar os efeitos sobre parâmetros da HIC.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abrahamse SL, Kloots WJ, Amelvoort JMMV. Absorption, distribution, and secretion of epicatechin and quercetin in the rat. *Nutrition Research*. 2005; 25(3):305-317.

Ader P, Wessmann A, Wolfram S. Bioavailability and metabolism of the flavonol quercetin in the pig. *Free Radic Biol Med*. 2000; 28(7):1056-1067.

Arboix A, García-Eroles L, Vicens A, *et. al.* Spontaneous Primary Intraventricular Hemorrhage: Clinical Features and Early Outcome. *ISRN Neurology*. 2012; 498303.

Aronowski J, Zhao X. Molecular pathophysiology of cerebral hemorrhage: secondary brain injury. *Stroke*. 2011; 42:1781–1786.

Azzini E, Vitaglione P, Intorre F, *et. al.* Bioavailability of strawberry antioxidants in human subjects. *Br J Nutr*. 2010; 104:1165-1173.

Banks WA. Blood-brain barrier as a regulatory interface. *Forum Nutr*. 2010; 63:102-10.

Barratt GM. Therapeutic applications of colloidal drug carriers. *Pharmaceutical Science & Technology Today*. 2000; 3(5):163-171.

Bischoff SC. Quercetin: potentials in the prevention and therapy of disease. *Curr. Opin. in Clin*. 2008; (11):733-740.

Boisseau P, Loubaton B. Nanomedicine, nanotechnology in medicine. *C. R. Physique*. 2011; 12:620–636.

Boots W, Haenen R, Bast A. Health effects of quercetin: From antioxidant to nutraceutical. *European Journal of Pharmacology*. 2008; 585:325-337.

Bouzat P, Sala N, Payen JF, *et. al.* Beyond intracranial pressure: optimization of cerebral blood flow, oxygen, and substrate delivery after traumatic brain injury. *Annals of Intensive Care*. 2013; 3:23.

Bruxel F, Laux M, Wild L, *et. al.* Nanoemulsões como sistemas de liberação parenteral de fármacos. *Química Nova*. 2012; 35 (9):1827-1840.

Burgess P, Hutt PB, Farokhzad OC, *et. al.* On firm ground: IP protection of therapeutic nanoparticles. *Nature biotechnology*. 2010; 28(12): 1267- 1270.

Cardoso FL, Brittes D, Brito MA. Looking at the blood-brain barrier: Molecular anatomy and possible investigation approaches. *Brain Research reviews*. 2010; 64(2): 328-363.

Chakraborty S, Shukla D, Mishra B, *et. al.* Lipid – An emerging platform for oral delivery of drugs with poor bioavailability. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2009; (73):1–15.

Chen M, Awe OO, Chen-Roetling J, *et. al.* Iron regulatory protein-2 knockout increases perihematomal ferritin expression and cell viability after intracerebral hemorrhage. *Brain Res*. 2010; 1337:95–103.

- Constantinides PP, Chaubal MV, Shorr R. Advances in lipid nanodispersions for parenteral drug delivery and targeting. *Adv Drug Deliv Rev.* 2008; (60):757–767.
- Cornard JP, Dangleterre L, Lapouge C. Computational and spectroscopic characterization of the molecular and electronic structure of the Pb(II)-quercetin complex. *J. Chem. A. Phys.* 2005; 109(44):10044-10051.
- Couvreur P, Dubernet C, Puisieux F. Controlled drug delivery with nanoparticles: current possibilities and future trends. *European Journal of Biopharmaceutics.* 1995; (41): 2-13.
- Couvreur P, Tulkens P, Roland M, *et. al.* Nanocapsule technology: a review. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2002; 303:928-936.
- Day AJ, Cañada FJ, Díaz JC, *et. al.* Dietary flavonoid and isoflavone glycosides are hydrolysed by the lactase site of lactase phlorizin hydrolase. *Febs Lett.* 2000; 468(2-3):166-170.
- Davies PM. *Exatamente no centro.* 1996. Manole, 1ª ed. São Paulo/SP.
- Dora CL. *Nanocarreadores lipídicos contendo quercetina: desenvolvimento, caracterização físico-química e avaliação biológica in vivo.* Tese de Doutorado. 2010.
- Dora CL, Silva LFC, Tagliari MP, *et. al.* Formulation Study of Quercetin-Loaded Lipid-Based Nanocarriers Obtained by Hot Solvent Diffusion Method. *Latin American Journal of Pharmacy.* 2011; (2):30.
- Dziedzic T. Clinical significance of acute phase reaction in stroke patients. *Front Biosci.* 2008; 13:2922–2927.
- Egert S, Wolfram S, Bosy-Westphal A, *et. al.* Daily quercetin supplementation dose-dependently increases plasma quercetin concentrations in healthy humans. *J Nutr.* 2008; 138:1615-1621.
- Ellison D, Love S, Chimelli L, *et. al.* *Neuropathology. A reference text of CNS pathology,* 2nd edition. London: Mosby 2004.
- Erlund I. Review of the flavonoids quercetin, hesperetin, and naringenin. Dietary sources, bioactivities, bioavailability, and epidemiology. *Nutrition Research.* 2004. 24:851-874.
- Gabathuler R. Approaches to transport therapeutic drugs across the blood–brain barrier to treat brain diseases. *Neurobiology of Disease.* 2010; 48–57.
- Ghosh A, Sarkar S, Mandal AK. Neuroprotective Role of Nanoencapsulated Quercetin in Combating Ischemia-Reperfusion Induced Neuronal Damage in Young and Aged Rats. *PLOS ONE.* 2013; 8(4): 1-12.
- Goldstein BL, Davis JN. Beam-walking in rats: studies towards developing an animal model of functional recovery after brain injury. 1990; 31(2): 101-107.

(Goldstein BL, Barnett BR, Roesch MR. Ventral striatum encodes past and predicted value independent of motor contingencies. *J Neurosci*. 2012; 32(6): 2027–2036).

Gregory SK. Quercetin. *Alternative Medicine Review*. 2009; (16):2.

Hammond MD, Ai Y, Sansing LH. Gr1 + macrophages and dendritic cells dominate the inflammatory infiltrate 12h after experimental intracerebral hemorrhage. *Translational Stroke Research* . 2012; 3 (1):125–131.

Hartmana R, Lekic T, Rojas H. Assessing functional outcomes following intracerebral hemorrhage in rats. *Brain research*. 2009; 1280:148 – 157.

Harwood M, Danielewska-Nikiel B, Borzelleca JF, *et. al.* A critical review of the data related to the safety of quercetin and lack of evidence of in vivo toxicity, including lack of genotoxic/carcinogenic properties. *Food and Chemical Toxicology*. 2007; 45:2179-2205.

Hauss DJ. Oral lipid-based formulations. *Adv. Drug Deliv*. 2007; (59):667-676.

Hazrati LN, Bergeron C, Butany J. Neuropathology of cerebrovascular diseases. *Semin Diagn Pathol*. 2009; 26:103–115.

Hollman PC, Bijsman MN, Van Gameren Y, *et. al.* The sugar moiety is a major determinant of the absorption of dietary flavonoid glycosides in man. *Free Radic Res*. 1999; (6):569-573.

Hou J, Manaenko A, Hakon J, *et. al.* Liraglutide, a long-acting GLP-1 mimetic, and its metabolite attenuate inflammation after intracerebral hemorrhage. *J Cereb Fluxo Sanguíneo Metab*. 2012; 32 (12):2201-2210.

Iadecola S, Anrather J. The immunology of stroke: from mechanisms to translation. *Nature medicine*. 2011; (17):7.

Iadecola C, Anrather J. Stroke research at a crossroad: asking the brain for directions. *Nat. Neurosci*. 2011; 14:1363-1368.

Jain V, Langham MC, Wehrli FW. MRI estimation of global brain oxygen consumption rate. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*. 2010; (30):1598–1607.

Jin F, Nieman DC, Shanely RA, *et. al.* The variable plasma quercetin response to 12-week quercetin supplementation in humans. *Eur J Clin Nutr*. 2010; 64:692-697.

Kalra L. Stroke rehabilitation 2009: old chestnuts and new insights. *Stroke*. 2010; 41(2):88-90.

Katsuki H. Therapeutic effect of nicotine in a mouse model of intracerebral hemorrhage. *J Pharmacol Sci*. 2010; 114:366-378.

Keep R, Hua Y, Xi G. Intracerebral haemorrhage: mechanisms of injury and therapeutic targets. *Lancet Neurology*. 2012; 11(8):720–731.

Keep RF, Xiang J, Ennis SR, *et. al.* Blood-brain barrier function in intracerebral hemorrhage. *Acta Neurochir Suppl.* 2008; 105 :73–7.

Krishnamurthi RV, Feigin VL, Forouzanfar MH, *et. al.* Behalf of the Global Burden of Diseases, Injuries, and Risk Factors Study 2010 (GBD 2010) and the GBD Stroke Experts Group. Global and regional burden of first-ever ischaemic and haemorrhagic stroke during 1990–2010: findings from the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet Glob Health* 2013; published online Oct 24. [http://dx.doi.org/10.1016/S2214-109X\(13\)70089-5](http://dx.doi.org/10.1016/S2214-109X(13)70089-5).

Lekic T, Hartman R, Rojas H, *et. al.* Characterization of the brain injury, neurobehavioral profiles, and histopathology in a rat model of cerebellar hemorrhage. *J Neurotrauma.* 2010; 27:627-637.

Li H, Zhao X, Ma Y, *et. al.* Enhancement of gastrointestinal absorption of quercetin by solid lipid nanoparticles. *J Control Release.* 2009; 133:238-244.

Lifen C, Xuefeng Z, Jing C, *et. al.* Increased Striatal Injury and Behavioral Deficits after Intracerebral Hemorrhage in Hemopexin Knockout Mice. *J Neurosurg.* 2011; 114(4): 1159–1167.

Lincoln NB, Parry RH, Vass CD. Randomized, controlled trial to evaluate increased intensity of physiotherapy treatment of arm function after stroke. *Stroke.* 1999; 30(3):573-9.

Liu Y, Liu Y, Dai Y, *et. al.* Enteric disposition and recycling of flavonoids and ginkgo flavonoids. *J Altern Complement Med.* 2003; 9(5):631-640.

Löscher W, Potschka H. Drug resistance in brain diseases and the role of drug efflux transporters. *Nature Reviews Neuroscience.* 2005; 6:591-602.

Lotufo PA, Goulart AC, Bustos IR, *et. al.* A stepwise approach to stroke surveillance in Brazil: the EMMA (Estudo de Mortalidade e Morbidade do Acidente Vascular Cerebral) study. *Journal of Stroke.* 2010; 5:284–289.

MacLellan CL, Auriat AM, McGie SC, *et. al.* Gauging recovery after hemorrhagic stroke in rats: implications for cytoprotection studies. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2006; 26:1031–1042.

Macrae IM. Preclinical stroke research-advantages and disadvantages of the most common rodent models of fo-cal ischaemia. *Br J Pharmacol.* 2011; 164(4):1062-1078.

Manach C, Williamson G, Morand C, *et. al.* Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *Am J Clin Nutr.* 2005; 81(1): 230S-242S.

Mehdipour AR, Hamidi M. Brain drug targeting: a computational approach for overcoming blood–brain barrier. *Drug Discov.* 2009; (14):1030–1036.

Mehnert W, Mäder K. Solid lipid nanoparticles: Production, characterization and applications. *Advanced Drug Delivery Reviews.* 2001; 47(2-3):165-196.

- Mendoza-wilson AM, Glossman-mitnik D. CHIH-DFT determination of the molecular structure, infrared and ultraviolet spectra of the flavonoid quercetin. *J. Mol. Struct. (Theochem)*. 2004; 681(1-3):71-76.
- Mergenthaler P, Meisel A. Do stroke models model stroke? *Disease Models & Mechanisms*. 2012; (5):718-725.
- Michalski D, Härtig W, Schneider D, *et. al.* Use of normobaric and hyperbaric oxygen in acute focal cerebral ischemia - a preclinical and clinical review. *Acta Neurol Scand*. 2011; 123(2):85-97.
- Moon YJ, Wang L, DiCenzo R, *et. al.* Quercetin pharmacokinetics in humans. *Biopharm Drug Dispos*. 2008; 29(4): 205-217.
- Murota K, Terao J. Antioxidative flavonoid quercetin: implication of its intestinal absorption and metabolism. *Arch Biochem Biophys*. 2003; 417(1)12-17.
- Németh K, Plumb GW, Berrin JG, *et. al.* Deglycosylation by small intestinal epithelial cell beta-glucosidases is a critical step in the absorption and metabolism of dietary flavonoid glycosides in humans. *Eur J Nutr*. 2003; 42(1):29-42.
- Ohnishi M, Katsuki H, Fujimoto S, *et. al.* Involvement of thrombin and mitogen-activated protein kinase pathways in hemorrhagic brain injury. *Exp Neurol*. 2007; 206:43–52.
- Okauchi M, Hua Y, Keep RF. Deferoxamine Treatment for Intracerebral Hemorrhage in Aged Rats: Therapeutic Time Window and Optimal Duration. *Stroke*. 2010; 41:375-382.
- Oliveira EJ, Watson DG, Grant MH. Metabolism of quercetin and kaempferol by rat hepatocytes and the identification of flavonoid glycosides in human plasma. *Xenobiotica*. 2002; 32(4):279-287.
- Papacocea T, papacocea R, Bădărău A, *et. al.* Oxidative stress and antioxidant therapy in intracerebral hemorrhage. *Therapeutics, pharmacology and clinical toxicology*. 2011; 270-273.
- Pardridge WM. The blood – brain barrier: bottleneck in brain drug development. *NeuroRx*. 2005.; (2):3-14.
- Pashevin DA, *et al.* Antiatherogenic effect of quercetin mediated by proteasome inhibition in the aorta and circulating leukocytes. *Pharmacol Rep*. 2011; (63):4,1009-1018.
- Peppen RPS, Maissan FJF, Genderen FR, *et. al.* Outcome measures in physiotherapy management of patients with stroke: a survey into self-reported use, and barriers to and facilitators for use. *Physiotherapy Research International*. 2008; 13(4): 255–270.
- Qureshi AI, Mendelow AD, Hanley DF. Intracerebral Hemorrhage. *Lancet*. 2009; 373:1632-1644.

Rangel-ordóñez L, Nöldner M, Schubert-Zsilavec M. *et. al.* Plasma levels and distribution of flavonoids in rat brain after single and repeated doses of standardized Ginkgo biloba Extract EGb 761(R). *Planta Med.* 2010; 76 (15) :1683-90.

Rogério AP, Dora CL, Andrade EL, *et. al.* Effect of quercetin-loaded microemulsion in the eosinophilic inflammatory process in an experimental airway allergic inflammation. *Biochemical Pharmacology.* 2010; 61(4): 288-297.

Sacco RL, Kasner SE, Broderik JP, *et al.* An Updated Definition of Stroke for the 21st Century: A Statement for Healthcare Professionals From the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke.* 2013; 44:2064-2089.

Sanchari D, Ardhendu K, Aparajita G, *et. al.* Nanoparticulated Quercetin in Combating Age Related Cerebral Oxidative Injury. *Curr Aging Sci.* 2008; 1:169-174.

Schaar KL, Brennehan MM, Savitz SI. Functional assessments in the rodent stroke mode. *Exp Transl Stroke Med.* 2010; 2:13.

Soler EP, Ruiz VC. Epidemiology and Risk Factors of Cerebral Ischemia and Ischemic Heart Diseases: Similarities and Differences. *Current Cardiology Reviews.* 2010; (6): 138-149.

Taylor RA, Sansing LH. Microglial Responses after Ischemic Stroke and Intracerebral Hemorrhage. *Clin Dev Immunol.* 2013; 746068.

Tedesco AC, Simioni AR, Primo FL. Introdução a nanotecnologia. IN:MORALES, M.M. *Terapias avançadas: células tronco, terapia genica e nanotecnologia aplicada a saúde.* p. 237-246. São Paulo:atheneu, 2007.

Valério DA. Quercetin reduces inflammatory pain: inhibition of oxidative stress and cytokine production. *J of Nat Prod.* 2009; (72):11.1975-1979.

Walle T, Walle UK, Halushka PV. Carbon dioxide is the major metabolite of quercetin in humans. *J Nutr.* 2001; 131:2648-2652.

Williamson G, Barron D, Shimoi K, *et. al.* In vitro biological properties of flavonoid conjugates found in vivo. *Free Radic Res.* 2005; 39(5):457-469.

Wang J, Doré S. Inflammation after intracerebral hemorrhage. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism.* 2007; 27(5):894–908.

Wang L, Tabor R, Eastoe J, *et. al.* Formation and stability of nanoemulsions with mixed ionic–nonionic surfactants. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2009; (11)9772–9778.

Wu G, Li C, Wang L, *et. al.* Minimally invasive procedures for evacuation of intracerebral hemorrhage reduces perihematomal glutamate content, blood–brain barrier permeability and brain edema in rabbits. *Neurocrit Care.* 2011; 14:118-126.

Xi G, Keep RF, Hoff JT. Mechanisms of brain injury after intracerebral haemorrhage. *Lancet Neurol.* 2006; 5:53-63.



Ye G, Ya H, Richard F, *et. al.* Intracerebral Hemorrhage: Effects of Aging on Brain Edema and Neurological Deficits. *Stroke*. 2004; 35:2571-2575.

Youdim KA, Qaiser MZ, Begley DJ, *et. al.* Flavonoid permeability across an in situ model of the blood–brain barrier. *Free Radic Biol Med*. 2004; 36(5):592-604.

Yousef MI, Omar SAM, El-Guendi MI, *et. al.* Potential protective effects of quercetin and curcumin on paracetamol-induced histological changes, oxidative stress, impaired liver and kidney functions and haematotoxicity in rat. *Food and Chemical Toxicology*. 2010; (48):3246–3261.

Zhan MDY, Chen MDC, Suzuki MDH, *et. al.* Hydrogen gas ameliorates oxidative stress in early brain injury after subarachnoid hemorrhage in rats. *Crit Care Med*. 2012; (40): 4.